

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN BIOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO ACADÉMICO 2018-2019

TÍTULO:

Estrategias de edición genómica en la cianobacteria *Synechococcus elongatus*

AUTOR:

Javier Cambra Samper

RESUMEN

El trabajo consiste en una revisión bibliográfica relativa a los métodos de transformación y modificación genética de la cianobacteria *Synechococcus elongatus*, con la finalidad de realizar una clasificación y describir cada una de las estrategias que se pueden emplear para llevar a cabo la ingeniería genética de este microorganismo.

Se cuantifico la frecuencia de cada una de las estrategias de transformación y de los sistemas utilizados para la modificación genética en base a la información bibliográfica del NCBI, combinado el descriptor "*Synechococcus elongatus*" junto a los descriptores: "mutagenesis", "transformation" y "genetic modification". Las 82 publicaciones recopiladas se clasificaron en base a 3 criterios: el tipo de trabajo, los métodos de transformación y los sistemas de modificación genéticos empleados.

El mayor número de artículos correspondió a las búsquedas en las que se utilizó el término "Mutagenesis", lo que resultó en aproximadamente 4-6 veces el número de artículos recuperados para los otros términos. El número de artículos identificados en más de una búsqueda es relativamente bajo. Tan sólo 1 artículo en común se encontró en las 3 búsquedas independientes.

Entre los métodos que existen para introducir las construcciones en *Synechococcus elongatus*, se ha visto que la transformación natural es el sistema de transformación empleado en el 73% de los trabajos seleccionados en los que el DNA transformado se vehiculiza en forma de plásmido. A la transformación natural le sigue el método de la conjugación bacteriana en el que la bacteria *Escherichia coli* actúa como donador del plásmido que se moviliza. Este método representa el 19% y constituye el segundo más empleado. Finalmente, con una proporción del 8% encontramos la electroporación que representa el método menos frecuente. No se encontró ningún trabajo en el que se emplease más de un método de transformación.

La gran mayoría de artículos seleccionados utilizan como estrategias para la modificación genética el sistema de recombinación propio del hospedador (91%) y minoritariamente se emplean sistemas de recombinación heterólogos (sistema FLP/FRT) 5% y las estrategias de edición genómica basada en la tecnología CRISPR (4%), mucho más actual que quizás pueda aumentar en determinados contextos en los próximos años.

ABSTRACT

This paper consists of a bibliography review related to transformation and genetic modification methods of *Synechococcus elongatus*, a cyanobacteria. The aim is to classify and describe each possible strategy used to carry out the microorganism's genetic engineering.

The frequency of each transformation strategy and the systems used for genetic modification (according to NCBI's bibliography information) were quantified, combining the descriptor "*Synechococcus elongatus*" with other descriptors: "mutagenesis", "transformation" and "genetic modification". All 82 compiled publications were classified according to 3 rules: way of work, transformation methods and genetic modification systems employed.

Most of the articles are related to searches where the term "mutagenesis" was written, which turned to be approximately 4 to 6 times the number of articles recovered for other terms. The number of identified articles in more than a search is low. Only 1 article was common in 3 different searches.

Among the existing methods to introduce the constructions in *Synechococcus elongatus*, the natural transformation is been observed to be the employed transformation system in 73% of the selected works where the transformed DNA is passed on in plasmids. After the natural transformation, the next method is the bacterial conjugation, where the bacteria *Escherichia coli* acts as a donator of the moving plasmid. This method represents the 19% of the works, being the second most employed. Finally, 8% is represented by the electroporation, the less frequent method. No work which employed more than one transformation method was found.

Most of the selected articles use the recombination system typical of hosting bacteria (91%) as strategies for genetic modification. 5% of the remaining articles employ heterologous recombination system (FLP/FRT system) and 4% bet on genomic edition strategies based on CRISPR technology, an up-to-date strategy that might grow in some contexts in the following years.

PALABRAS CLAVES

Synechococcus elongatus, técnicas para la transformación, mecanismos para la modificación genética.

ABREVIATURAS

Synechococcus elongatus PCC 7942: *S. elongatus*

Escherichia coli: *E. coli*

Sitios neutros: SN

Secuencias diana de recombinasa: FRT

Recombinasa flipasa: FLP

RNA transcrito de CRISPR: crRNA

RNA precursor: pre-crRNA

Molécula transactivadora de crRNA: tracrRNAs

Ruptura de doble hebra: DSB

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	- 7 -
1.1 CIANOBACTERIAS: GENERALIDADES	- 7 -
1.2 <i>SYNECHOCOCCUS ELONGATUS</i> SP. COMO ORGANISMO MODELO.	- 8 -
1.3 ESTRATEGIAS DE EDICIÓN GENÓMICA EN <i>SYNECHOCOCCUS ELONGATUS</i>	- 8 -
1.3.1 TRANSFORMACIÓN NATURAL.....	- 9 -
1.3.2 CONJUGACIÓN	- 11 -
1.3.3 ELECTROPORACIÓN	- 12 -
1.3.4 SISTEMAS DE RECOMBINACIÓN PROPIOS	- 13 -
1.3.5 SISTEMAS DE RECOMBINACIÓN HETERÓLOGOS.....	- 17 -
1.3.6 SISTEMAS DE MODIFICACIÓN CRISPR	- 19 -
2. OBJETIVOS	- 23 -
3. METODOLOGÍA	- 23 -
3.1 BÚSQUEDAS Y CLASIFICACIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	- 23 -
3.2 GESTOR DE REFERENCIAS	- 23 -
3.3 HERRAMIENTAS DE VISUALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	- 24 -
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 24 -
4.1 ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA	- 24 -
4.2 CLASIFICACIÓN DE LAS REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 26 -
4.3 TÉCNICAS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE <i>S. ELONGATUS</i>	- 28 -
4.3.1 TRANSFORMACIÓN NATURAL.....	- 30 -
4.3.2 CONJUGACIÓN	- 31 -
4.3.3 ELECTROPORACIÓN	- 32 -
4.4 MECANISMOS PARA LA MODIFICACIÓN GENÉTICA.....	- 32 -
4.4.1 SISTEMAS DE RECOMBINACIÓN PROPIOS	- 33 -
4.4.2 SISTEMAS DE RECOMBINACIÓN HETERÓLOGOS.....	- 35 -
4.4.3 SISTEMAS DE MODIFICACIÓN CRISPR	- 35 -
5. CONCLUSIONES.....	- 36 -
6. PLAN DE TRABAJO	- 37 -
7. APÉNDICE	- 39 -
8. BIBLIOGRAFÍA.....	- 45 -

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cianobacterias: generalidades

Synechococcus elongatus pertenece al phylum Cianobacteria del dominio bacteria. Este filo es muy heterogéneo, en él se pueden encontrar tanto organismos unicelulares, como pluricelulares, con o sin diferenciación celular (Encinas, 2014). Las cianobacterias se caracterizan por ser un grupo de bacterias Gram negativas, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, mediante dos fotosistemas parecidos a los de las plantas. Son conocidas comúnmente como algas verde-azuladas debido a los pigmentos fotosintéticos que poseen, clorofila a y ficobiliproteínas (Stanier y Bazine, 1977).

Su presencia para la historia de la vida tiene un gran interés evolutivo, ya que se cree que aparecieron en la Tierra hace 2.500 millones de años. Las cianobacterias según la teoría endosimbiótica, fueron los precursores de los cloroplastos en las células vegetales, siendo los principales organismos responsables de la fotosíntesis y la fijación de CO₂ en medios marinos (Gray, 1992); y las responsables del 30% de la producción de oxígeno global (Hall y Rao, 1999). Contribuyeron así, en el pasado, al cambio de una atmósfera anaerobia a una oxigénica, mediante la liberación de oxígeno molecular, como producto resultante de la fotosíntesis, que es necesario para la respiración aeróbica, oxigénica (Buick, 1992). Además como comparten propiedades fotosintéticas similares con otros organismos fotosintéticos oxigenados, se han utilizado como organismos modelo para la investigación de la fotosíntesis (Brocks *et al.*, 1999; Encinas, 2014).

Este grupo de microorganismos también tiene un importante papel ecológico ya que participan en los ciclos globales de carbono y nitrógeno, gracias a su un metabolismo fotosintético obligado o facultativo y su capacidad de asimilar múltiples fuentes de nitrógeno en forma de amonio, nitrato, nitrito, etc. o fijando N₂ atmosférico (Encinas, 2014).

Las cianobacterias son también las únicas procariotas demostradas hasta ahora que tienen sistemas circadianos similares a organismos eucarióticos ([ver apartado 4.4.1: Sistemas de recombinación propios](#)) (Golden *et al.*, 1997).

1.2 *Synechococcus elongatus* sp. como organismo modelo.

Synechococcus elongatus fueron identificadas por primera vez por Geitler, en Alemania, durante el año 1925. Más tarde, Frenkel, en 1950, descubrió *Synechococcus elongatus* en pequeñas piscinas llenas de agua de lluvia, ubicadas en Massachusetts. (Frenkel, Gaffron y Battley, 1950). Se caracterizan por ser un procariota unicelular, cuyas células se dividen por fisión binaria, ser fotoautótrofos obligados y habitar ecosistemas de agua dulce, con un rango de temperatura mesófila o moderada y tener la capacidad de sobrevivir con bajos nutrientes (Waterbury, 1987). Actualmente, se han secuenciado varios genomas de *Synechococcus elongatus* (anteriormente conocido como *Anacystis nidulans*): PCC 6301, PCC 7942, UTEX 2973 y UTEX 3055.

Synechococcus elongatus PCC 7942 (a partir de ahora *S. elongatus*), es el organismo modelo en el laboratorio de genética cianobacteriana de la UA. Se ha convertido en una estirpe modelo en los estudios de las cianobacterias, gracias a su tiempo de regeneración, relativamente corto (mayor tasa de crecimiento en comparación con las plantas) y la relativa facilidad para ser transformada con DNA exógeno en comparación con las algas eucarióticas. Se caracteriza por tener un tamaño que oscila entre 1-1,2 μm , tener forma bacilar y contener un cromosoma de 2,7 Mb junto a dos plásmidos: pANL de 46 Kb y pANS de 8 Kb, siendo así uno de los organismos fotosintéticos con el tamaño cromosómico más reducido (Sugita *et al.*, 2007; Encinas, 2014).

1.3 Estrategias de edición genómica en *Synechococcus elongatus*

Con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante en la década de los setenta nace la ingeniería genética. Gracias a este hito, los científicos pueden manipular el material genético y, así incorporar moléculas de ADN foráneos para que esa célula obtenga las características deseadas y estudiar a nivel de estructura, organización y función como de regulación, expresión y evolución de un gen. Con el paso del tiempo van apareciendo nuevas técnicas significativamente más eficaces y a un coste comparativamente más económico, siendo así mucho más accesibles (Jackson, Symons y Berg, 1972).

Para conseguir editar el genoma primero se tiene que insertar un fragmento de ADN específico, como un gen, en otro fragmento de ADN llamado plásmido. Este paso usa enzimas de restricción y ADN ligasa, y se llama ligación. Después de una ligación, el

siguiente paso es transferir el ADN a las bacterias en un proceso llamado transformación. *S. elongatus* fue la primera cianobacteria en la que se descubrió su transformabilidad por ADN exógeno (Shestakov y Khyen, 1970). Estas cianobacterias son capaces de incorporar ADN mediante transferencia genética horizontal, utilizando como principales métodos la transformación natural, la conjugación o la electroporación, permitiendo la entrada de moléculas al interior celular.

Una vez las moléculas estén dentro de la célula tiene que incorporarse al genoma, por ejemplo, en *S. elongatus* se utilizan principalmente los métodos de recombinación propios, recombinación heteróloga o CRIPRS/Cas. Sin embargo, las cianobacterias plantean más desafíos que otros organismos heterotróficos, debido a que cada célula posee más de una copia del genoma (Kusakabe *et al.*, 2013; Ramey *et al.*, 2015).

Encontramos también otros inconvenientes que ha habido que tener en cuenta para modificar a *S. elongatus*, estos consisten en distintas formas para protegerse del DNA exógeno (normalmente vírico) que ingrese en la bacteria: Los **sistemas de restricción-modificación**, consiste en la eliminación de las secuencias ajenas al genoma de estas por enzimas de restricción del organismo. El ADN propio no sufre delección, puesto que previamente han sido modificado por metilación. (Stucken, Koch y Dagan, 2013). Las **barreras físicas** incluyen la presencia de nucleasas inespecíficas extracelulares, la producción de exopolisacáridos y mecanismos desconocidos para la competencia natural (Stucken, Koch y Dagan, 2013). La **barrera funcional** está determinada por la capacidad del ADN extraño para replicarse en el huésped, ya sea a partir de un plásmido de replicación autónoma o por integración en el genoma del huésped (Stucken, Koch y Dagan, 2013).

1.3.1 Transformación natural

La transformación natural bacteriana consiste en un mecanismo de transferencia genética horizontal, usado en la naturaleza, que utiliza la maquinaria genética bacteriana específica, para introducir el ADN exógeno a través de la membrana y así, posteriormente, poder ser incorporado al genoma.

Para ello, *S. elongatus* tiene que entrar en un estado de competencia, y así, captar activamente ADN del medio extracelular. Este estado de competencia se puede inducir mediante distintos tipos de tratamientos, físico y / o químico que mejore su capacidad

para absorber el ADN. También se ha descubierto que la perturbación de la fotosíntesis mejora la eficiencia del proceso de transformación, sin dañar las células receptoras del DNA exógeno (Goldent y Sherman, 1984).

Lo común es que una molécula de ADN captada de esta manera se degradará, pero en ocasiones puede sobrevivir y replicarse en la célula huésped. Principalmente, esto sucede si la molécula de ADN es un plásmido, el cual podemos producir en el laboratorio, con un origen de replicación reconocido o no por las cianobacterias (Figura 1) (Chen y Dubnau, 2004; Claverys, Martin y Polard, 2009; Brown, 2016).

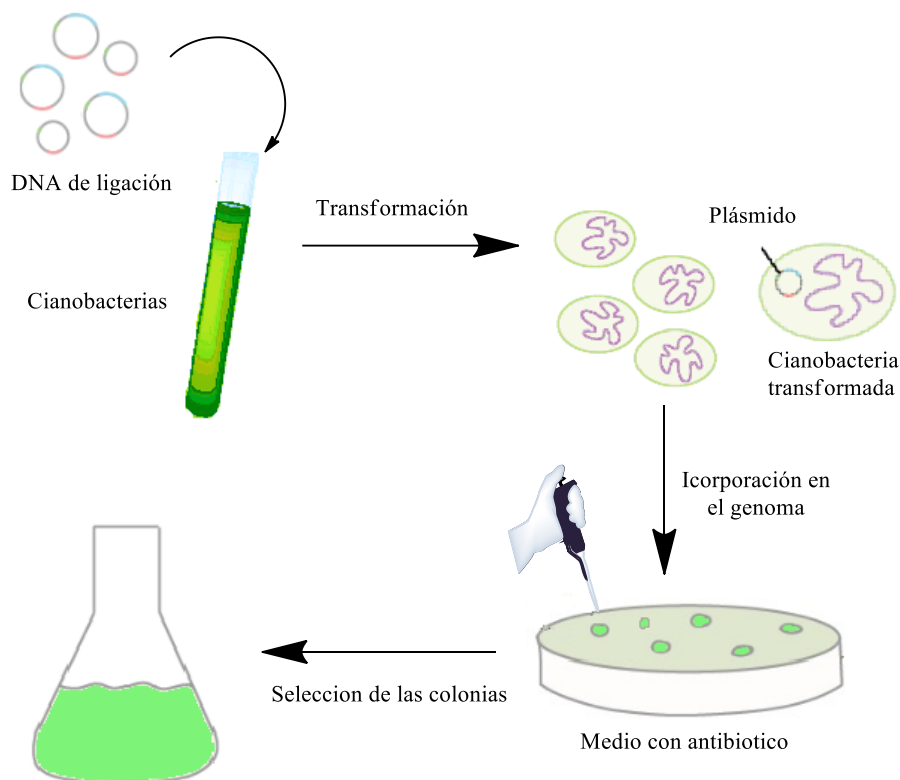


Figura 1. Esquema del proceso de transformación bacteriana. Introducción de un plásmido dentro de *S. elongatus*, mediante transformación natural y posterior selección de las células que integran el DNA exógeno en el genoma o en el interior de la célula si se trata de un plásmido con origen de replicación cianobacteriano.

1.3.2 Conjugación

La conjugación consiste en la transferencia de material genético entre una célula procariota donadora y una receptora mediante un contacto directo o una conexión que las una (Holmes and Jobling, 1996). Para obtener una transferencia estable, es necesario que se produzca el contacto, se transfiera la restricción o escape de la degradación ([ver apartado 1.3 Estrategias de edición genómica en *Synechococcus elongatus*](#)), y que el ADN se pueda replicar de forma autónoma o se integre en uno de los replicones (unidades de ADN en los cuales ocurre un acto individual de replicación) del receptor (Elhai and Wolk, 1988).

El plásmido que se utiliza para introducir una secuencia de ADN particular en las cianobacterias (que generalmente no debe replicarse en cianobacterias), se denomina plásmido de carga y debe contener: las secuencias necesarias para la replicación en la cepa de *E. coli* (donador preferido para la transferencia de genes a las cianobacterias, mediante conjugación), marcadores seleccionables (para la selección en los dos hospedadores de interés), sitios de clonación y un replicón movilizable. Se utiliza también un plásmido para la conjugación y otro auxiliar, para ser movilizado en *S. elongatus* (Wolk *et al.*, 1984; Clerico, Ditty y Golden, 2007).

Hay dos requisitos que deben cumplirse para que un plásmido sea movilizado por un plásmido conyugal. Primero, el plásmido debe contener un tramo de ADN llamado origen de replicación (por razones de movilidad; también llamada región de *oriT*). En segundo lugar, el plásmido debe codificar o estar provisto de una proteína de corte de ADN (codificada por un gen denominado *mob*) que reconoce específicamente el origen (Figura 2) (Willetts y Wilkins, 1984; Wolk *et al.*, 1984).

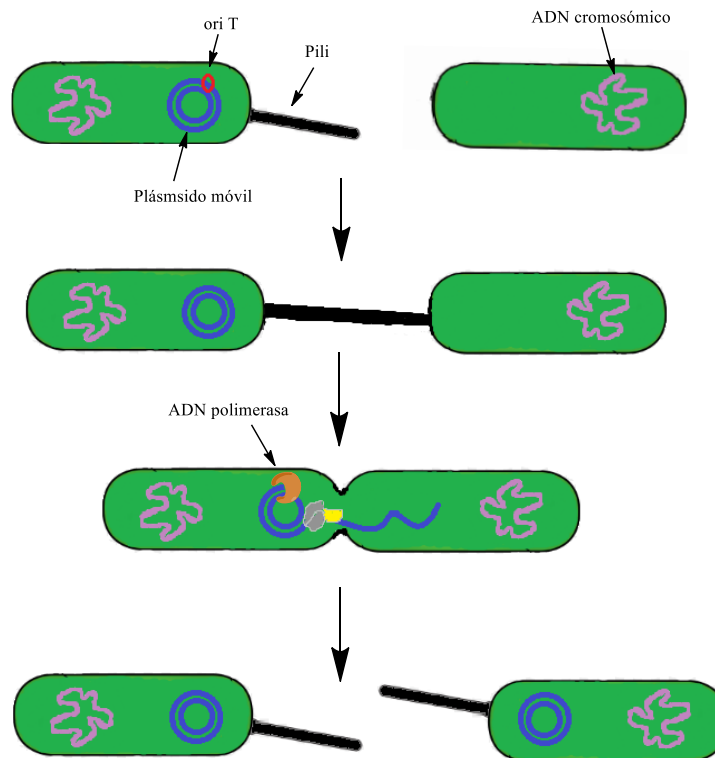


Figura 2. Proceso de la conjugación. La célula donadora *E. coli* (izda.), traspara un plásmido a *S. elongatus* (dcha.), mediante contacto.

1.3.3 Electroporación

La electroporación consiste en la exposición de las células a un campo eléctrico pulsado para crear agujeros o poros transitorios en la membrana plasmática, lo suficientemente grandes para facilitar así la difusión del ADN foráneo hacia la célula huésped (Andreason, 1993). Esto significa, que se aplican pulsos intermitentes, de un voltaje de alta intensidad y muy corta duración entre dos electrodos.

Estos pulsos se producen gracias a un electroporador, que usa un condensador eléctrico (dispositivo de dos placas paralelas que permite el almacenamiento de corriente eléctrica) que produce el campo eléctrico requerido. Este campo eléctrico de duración de apenas unos 10 μ s genera poros instantáneos en la célula y permite el paso del ADN (Figura 3) (Barbosa-Cánovas et al., 2001).

Encontramos diferentes teorías para explicar por qué se produce el poro y como penetra el ADN. La teoría más aceptada, actualmente, para explicar en qué consiste la electroporación es la formación de poros hidrofílicos. En ausencia de un campo eléctrico

externo, se producen en las membranas la formación y cierre de poros hidrofílicos de tamaño muy pequeño (< 1 nm) y de una vida media inferior a 1 nanosegundo como consecuencia de fluctuaciones térmicas y mecánicas. La formación de estos poros se fundamenta en el hecho de que se ha observado que el agua y algunos iones penetran a través de las membranas a una velocidad demasiado elevada para tratarse de un fenómeno de difusión a través de una bicapa lipídica intacta. Según estas teorías, el potencial transmembrana provocado por la aplicación del campo eléctrico externo disminuye la energía que se requiere para la formación de estos poros hidrofílicos que se forman espontáneamente favoreciendo la formación de un mayor número de poros y más estables, es decir, que permanecen abiertos durante más tiempo (Weaver y Chizmadzhev, 1996).

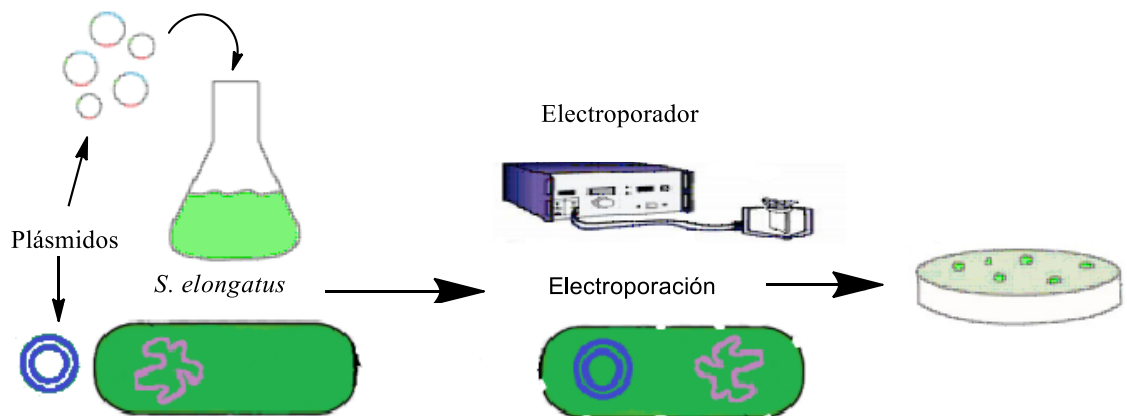


Figura 3. Proceso de la electroporación. Tras añadir los plásmidos en la disolución con células de *S. elongatus*, e introducirlo en el electroporador, se crean los poros en las células, para poder ser transformadas con los plásmidos presentes en el medio extracelular.

1.3.4 Sistemas de recombinación propios

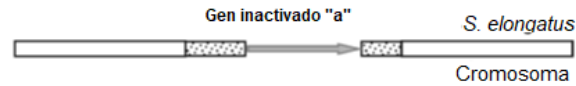
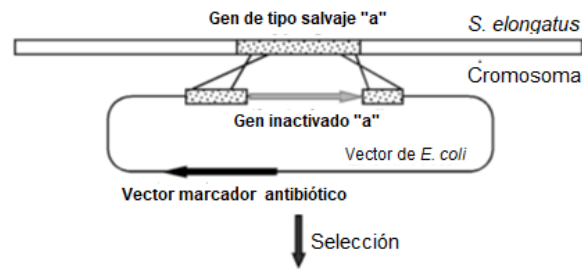
Una ventaja clave de *S. elongatus* es la facilidad para poder ser modificada mediante ingeniería genética, ya que pueden absorber ADN lineal o circular de doble cadena e incorporarlo en sus genomas a través de un sistema eficiente de recombinación homóloga (Clerico, Ditty y Golden, 2007; Vogel, Lale y Hohmann-Marriott, 2017).

La recombinación homóloga consiste en el intercambio recíproco de información genética entre dos moléculas de ADN (Szostak *et al.*, 1983). Para que se produzca la recombinación entre el cromosoma y el ADN exógeno (que no se replica de forma

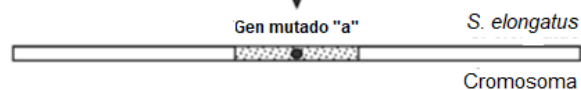
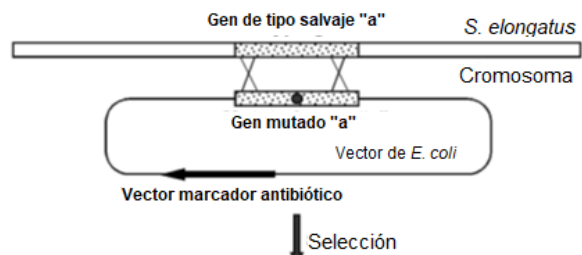
autónoma), este tiene que estar vinculado a secuencias homólogas del cromosoma. Al incorporar un marcador de selección dentro de la región de homología, las secuencias diseñadas se dirigen a un lugar en particular. Una de las aplicaciones es la inactivación o sustitución por inserción de un gen, reemplazando el gen de interés con un alelo que tiene un casete heterólogo (generalmente un casete de resistencia a antibióticos) insertado dentro de su marco de lectura abierto (Figura 4) (Clerico, Ditty y Golden, 2007).

Los organismos procarióticos tienen operones policistrónicos, un grupo de genes que forman parte de la misma unidad de transcripción, por eso la inserción de un marcador seleccionable dentro de un marco de lectura abierto puede ejercer efectos polares en los genes vecinos. Además, cuando se inactivan varios genes dentro de la misma cepa, el uso de muchos antibióticos diferentes para seleccionar varias inserciones puede tener efectos acumulativos y perjudiciales sobre la viabilidad del cultivo celular. Debido a estos dos problemas, se desarrollaron dos sistemas de reemplazo de alelos para el intercambio alélico, conocidos como reemplazo de alelos "hit-and-run" y reemplazo de genes mediado por *rps12*. La ventaja de estas estrategias es que introducen las mutaciones sin dejar evidencia genética residual del proceso mutagénico, como un marcador de resistencia a antibióticos. Los genes de *S. elongatus* también pueden expresarse ectópicamente en sitios llamados "sitios neutrales". El término neutral hace referencia a que la modificación de esos sitios genómicos no provoca cambios fenotípicos. Hay descritos tres sitios dentro del genoma donde pueden recombinarse de forma homóloga las secuencias de interés para generar su expresión ectópica.

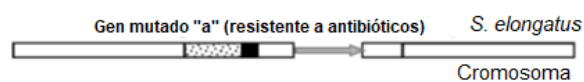
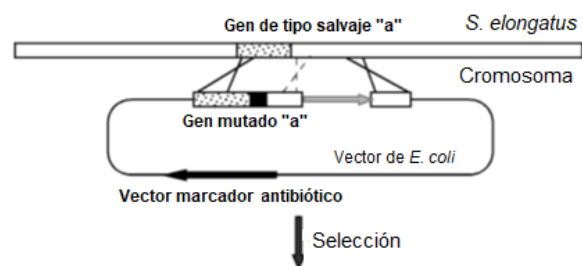
A Inactivación de genes por inserción de un casete de resistencia a antibióticos



B Reemplazo de genes por un alelo mutado que confiere un fenotipo seleccionable



C Adición o cambio de secuencia en un extremo de un gen



D Integración de plásmidos mediante la selección de un solo evento de recombinación

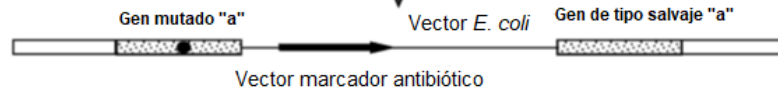
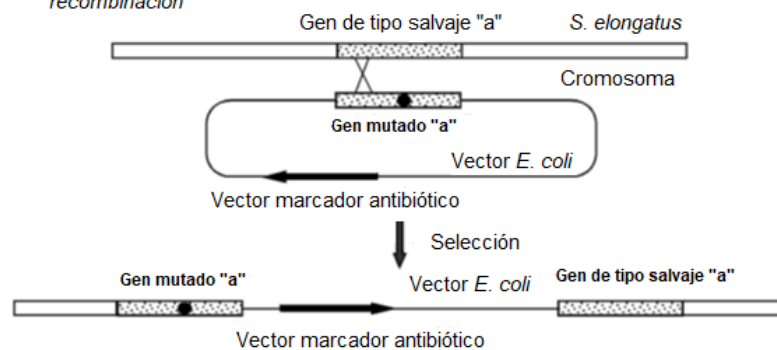


Figura 4. Mutagénesis del cromosoma de *S. elongatus* por recombinación homóloga. (A) mediante la inserción de un casete de resistencia a antibióticos (B) Sustitución de genes por un alelo mutado que confiere un fenotipo seleccionable. (C) Adición o cambio de secuencia en un extremo de un gen. (D) Integración de plásmidos mediante la selección del evento de recombinación única. Adaptado de (Clerico, Ditty y Golden, 2007).

Reemplazo de alelo Hit-and-Run. El alelo mutante se clona en un vector que lleva marcadores seleccionables positivos y negativos. El marcador positivo selecciona la incorporación del plásmido recombinante en *S. elongatus* a través de un único evento de recombinación; este es un casete que confiere resistencia a kanamicina, cloranfenicol o estreptomicina, dependiendo de la versión del vector elegido para la clonación. El marcador negativo, que selecciona un segundo evento de recombinación que escinde el plásmido del cromosoma, es el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*. El gen *sacB* codifica la enzima levan sacarosa, que, en presencia de sacarosa, genera compuestos que son tóxicos para muchas bacterias gram negativas (Andersson *et al.*, 2000).

Reemplazo de gen mediado por *rps12*. A menudo se requieren múltiples reemplazos de genes dirigidos para los análisis funcionales de los genomas de cianobacterias. El reemplazo de los genes cromosómicos en las cianobacterias a menudo se basa en la disponibilidad de marcadores de resistencia a los medicamentos y, por lo tanto, se han restringido los reemplazos múltiples.

El reemplazo de los genes en cianobacterias mediados por un gen *rps12* que confiere sensibilidad a estreptomicina y se trata de un alelo dominante, permite la selección de mutantes libres de marcadores de resistencia a antibióticos mediante mutaciones puntuales, supresiones o inserciones.

Este procedimiento comienza con una cepa cianobacteriana resistente a estreptomicina, para ello se introduce un cambio de una sola base en la secuencia del gen *rps12*, que codifica la proteína de la subunidad S12 del ribosoma 30S, en *S. elongatus* para producir una cepa resistente a estreptomicina.

A continuación, es transformado con un plásmido que contiene la secuencia del gen que se cambiará por una copia del gen *rps12* de tipo salvaje de *Synechocystis* PCC 6803 (*rps12*-6803), dirigido por el promotor de *S. elongatus* *psbA1* y un casete de resistencia a la kanamicina. Mediante recombinación homologa conseguimos insertar la construcción en el lugar de la mutación, convirtiendo la célula en kanamicina resistente (cassette) y estreptomicina sensible (el alelo salvaje *rps12* es dominante). Por último esta cepa se transforma con la copia final del gen cianobacteriano, que no necesita llevar un marcador seleccionable. El gen *rps12* de tipo salvaje se elimina del cromosoma cianobacteriano mediante recombinación homóloga con el alelo final que

se reemplazará. A medida que se eliminan *rps12*, se vuelve resistente a estreptomicina. La selección para la resistencia a la estreptomicina ocurre sin necesidad de un marcador en el alelo que reemplaza a *rps12-6803* (Ogawa, Matsuoka y Takahama, 2001; Takahama *et al.*, 2004).

Recombinación homóloga en sitios neutros de cromosomas de *S. elongatus*. *S. elongatus* posee al menos tres sitios en el cromosoma, llamados "sitios neutrales" (SN), donde se pueden insertar secuencias ectópicas sin generar ningún fenotipo no deseado. Cualquier ADN de interés puede insertarse en las secuencias SN de *S. elongatus* en un plásmido introducido en la cianobacteria y, por recombinación homóloga, trasladarse al cromosoma cianobacteriano. En este caso, la secuencia que se insertará se dirige a uno de estos sitios específicos en el cromosoma de *S. elongatus* mediante su clonación dentro de las secuencias de SN en plásmidos especializados llamados "vectores de sitio neutro".

Estos vectores contienen un marcador de resistencia a antibióticos y un sitio de clonación múltiple donde se puede insertar un gen de interés, flanqueado por secuencias SN de SN1, SN2 o SN3. Después de la introducción de plásmidos en *S. elongatus*, los clones recombinantes resultantes se aíslan mediante selección en medios que contienen el antibiótico adecuado (Clerico, Ditty y Golden, 2007).

1.3.5 Sistemas de recombinación Heterólogos

La recombinación *FLP-FRT* sirve para manipular el ADN de un organismo en condiciones controladas *in vivo*. Implica el uso de la recombinasa flipasa (FLP), que proviene de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta FLP promueve la recombinación eficiente entre dos sitios idénticos de recombinación FRT (secuencias diana de la recombinasa) que están flanqueando una región genómica de interés. La recombinación entre estos sitios puede conducir a la inserción, escisión, inversión y translocación del ADN (Schlake y Bode, 1994; Sadowski, 1995).

Aunque el método tradicional para la modificación genética funciona bien, no se pueden realizar a gran escala, utilizando cianobacterias. Esto se debe a que el método de modificación tradicional depende de los marcadores seleccionables, y la ingeniería genética de múltiples loci génicos estará restringida por los números limitados de los marcadores disponibles. Además, el cultivo de las cianobacterias productoras de

biocombustibles con marcadores seleccionables que usan antibióticos en la escala industrial también puede hacer que el público se preocupe por la bioseguridad y aumentar el costo de todo el proceso. Por lo tanto, la eliminación de los marcadores seleccionables de los cianobacterianos mutantes que podrían hacer el reciclado de marcadores seleccionables será necesaria para la modificación genética a gran escala y la futura aplicación industrial de las cianobacterias (Figura 5.).

El sistema de recombinación FLP / FRT está codificado por el plásmido de 2 μ m (6.4 kb) que está presente en la mayoría de los aislados de *S. cerevisiae*. El sitio de FRT consiste en repeticiones palindrómicas separadas por un núcleo asimétrico de 8 pb. Debido a su sistema estable de partición y amplificación, este plásmido está disponible con un número de copias de 60 a 100 copias por célula (Futcher, 1986; Veit y Fangman, 1988). Si el número de copias cae por debajo de cierto nivel, la recombinasa FLP de 45 kDa cataliza la recombinación entre dos sitios de 599 pb. Estas secuencias están presentes en orientación invertida y permiten que el plásmido de 2 μ m exista en dos conformaciones: la conformación A, cuando está en silencio, y la conformación B, cuando puede replicarse y, por lo tanto, mantener un número constante de copias de plásmidos por célula (Vetter *et al.*, 1983). Solo 34 pb de FRT son necesarios para una recombinación exitosa (Senecoff, Bruckner y Cox, 1985). Para cada recombinación mediada por FLP, se necesitan un total de cuatro recombinasas FLP y dos secuencias FRT. Dos de las cuatro proteínas se unen a una secuencia de FRT porque cada FRT tiene dos sitios de unión a FLP de 13 pb que están interrumpidos por una región espaciadora de 8 pb. En este espaciador se produce una rotura de la cadena de ADN, que produce extremos sobresalientes de 8 pb. Después de la rotura de la hebra, los extremos sobresalientes de los dos fragmentos de FRT se juntan mediante el apareamiento de bases complementarias, de modo que se genera una secuencia de FRT recombinante (Sadowski, 1986; Amin *et al.*, 1991; Kopke, Hoff y Kück, 2010).

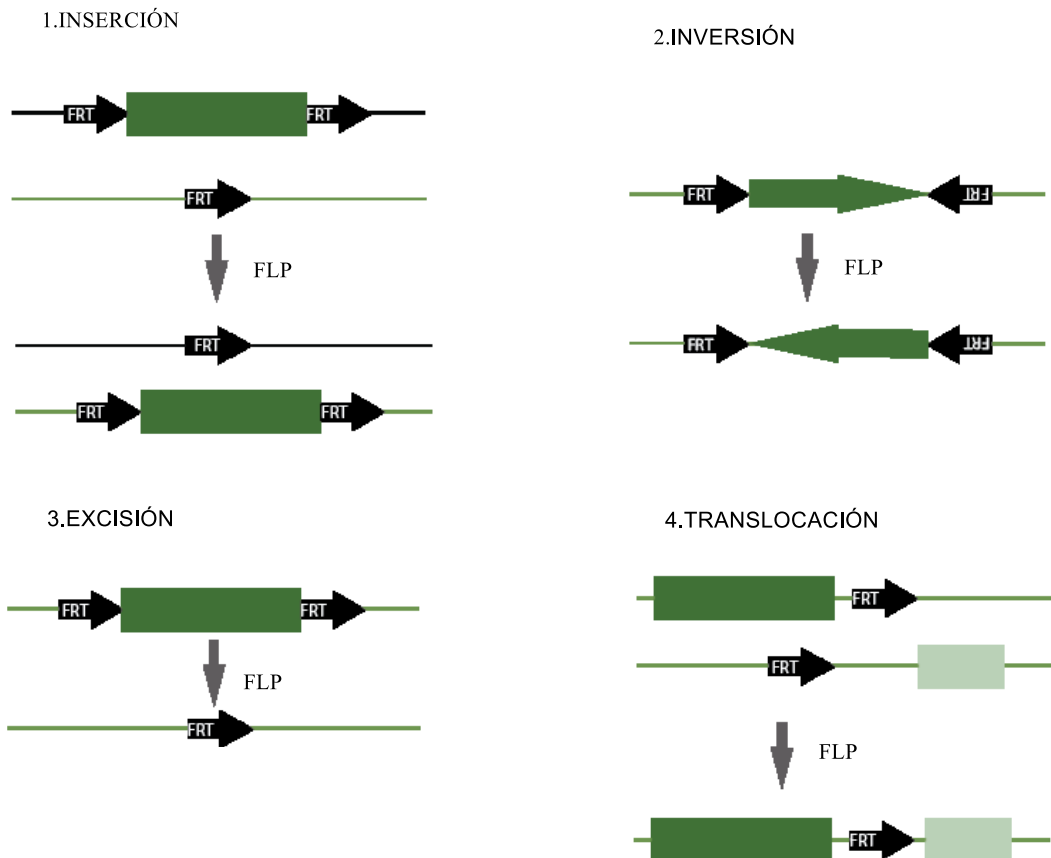


Figura 5. Recombinación mediada por FLP. La recombinación se ve afectada por la orientación y la ubicación de los sitios FRT. Los FRT tienen direccionalidad y se pueden colocar en una disposición cis (la misma cadena de ADN) o trans (diferentes cadenas de ADN). **1.** Si los FRT flanquean un segmento de ADN (rectángulo) en una disposición cis, están orientados en la misma dirección y en diferentes cadenas de ADN, la FLP media la inserción del segmento. **2.** Si los FRT flanquean el segmento de ADN en una disposición cis y están orientados en direcciones opuestas, la FLP media la inversión del segmento. **3.** Si los FRT flanquean un segmento de ADN en una disposición cis y están orientados en la misma dirección, la FLP mediata la escisión o circularización del segmento. **4.** Si los FRT están ubicados en diferentes cadenas de ADN y están orientados en la misma dirección, la FLP media una translocación del segmento.

1.3.6 Sistemas de modificación CRISPR

Esta herramienta consiste en un sistema de dos componentes, CRISPR y Cas. Estos conforman un método clave de defensa bacterianos, perteneciendo a un mecanismo adaptativo de adquisición de inmunidad y resistencia frente a material genético perjudicial, utilizado por bacterias y arqueas. En primer lugar, el huésped puede incorporar específicamente secuencias cortas de elementos genéticos invasores (virus o plásmido) en una región de su genoma, CRISPR, agrupadas en intervalos regulares. En segundo lugar, cuando estas secuencias se transcriben y procesan con precisión en

pequeños ARN, guían un complejo de proteínas multifuncional (proteínas Cas) para reconocer y escindir el material genético extraño entrante (Ishino *et al.*, 1987; Mojica *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 2002; Bhaya, Davison y Barrangou, 2011).

CRISPR (en inglés: Clustered, Regularly, Short, Palindromic, Repeat) son agrupaciones de repeticiones cortas palindrómicas regularmente interespaciadas. Este locus contiene:

1. Segmentos cortos de ADN espaciador. Estas secuencias son homólogas a otras pertenecientes a DNA vírico, de cromosomas y de plásmidos. Las secuencias que coincidían con las secuencias espaciadoras, se encuentran en elementos genéticos patógenos capaces de invadir al microorganismo, y reciben el nombre de protoespaciadores. (Mojica *et al.*, 2005; Pourcel, Salvignol y Vergnaud, 2005).
2. Las repeticiones que los separan.
3. Las secuencias líder en su extremo 5' precediendo a la primera repetición que incluye el promotor de la transcripción.

El locus **Cas** codifica para proteínas nucleasas relacionadas con los CRISPR. La enzima Cas9 se caracteriza por tener una arquitectura bilobular en la que uno de los lóbulos (REC) se encarga del reconocimiento de la diana y el otro (NUC) posee la actividad nucleasa, con dos dominios nucleasa y un dominio de reconocimiento de la secuencia PAM (Bhaya, Davison y Barrangou, 2011; Nishimasu *et al.*, 2014).

PAM es un componente del ADN invasor, pero no pertenece al locus CRISPR bacteriano. Significa motivo adyacente del protoespaciador, es una secuencia de ADN de solo 2-6 pares de bases que se encuentra justo después de la secuencia de ADN dirigida por la nucleasa Cas9. Consiste en un componente que distingue a la bacteria del material de ADN, Cas9 no se unirá con éxito si no está presente, evitando así que el locus CRISPR sea atacado y destruido por las nucleasas (Mali, Esvelt y Church, 2013; Shah *et al.*, 2013).

El sistema CRISPR-Cas es un mecanismo efectivo y específico que permite modificar los genes dentro de los organismos. Los espaciadores de los CRISPR reconocen secuencias específicas y guían a las nucleasas cas para cortar y degradar esos elementos génicos exógenos (Marraffini y Sontheimer, 2010). Este fue identificado por primera vez por un grupo de científicos japoneses en 1987 (Ishino *et al.*, 1987) y luego más tarde, por el científico Francisco J. M. Mojica (perteneciente a la universidad de

Alicante), publicado en 1993 (Mojica, Juez y Rodríguez-Valera, 1993). Se empezó a usar como herramienta de edición genómica, al poseer dos factores importantes para dicho propósito: una endonucleasa y una secuencia complementaria de reconocimiento. Al generar de manera artificial las secuencias repetidas se puede dirigir a la nucleasa a una región específica del ADN, pudiendo ser programada para desempeñar distintas funciones, como: disrupciones mediante inserciones, deleciones, modificaciones o ediciones endógenas y activación o represión de la expresión génica (Charpentier y Marraffini, 2014).

En el sistema CRISPR-Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes*, el locus CRISPR que comprende una serie de espaciadores directos que flanquean las repeticiones se transcribe en forma de RNA precursor (pre-crRNA) y, a continuación, este pre-crRNA da lugar a fragmentos más pequeños de RNA, RNA transcrito de CRISPR (crRNA) (Tang *et al.*, 2002). Este crRNA se asocia con molécula transactivadora de crRNA (tracrRNAs) y se procesa en CrRNA maduro / tracrRNA. Fusionando las dos estructuras de RNA del sistema (el crRNA y el tracrRNA) en una construcción abreviada como sgRNA se ve facilitado el corte del DNA diana *in vitro* (Gasiunas *et al.*, 2012). La presencia de esta secuencia, implica el reconocimiento por parte de Cas9 de la diana de corte, pues la endonucleasa con su crRNA / tracrRNA o sgRNA asociados primero reconoce a PAM produciéndose la unión DNA-Cas9, posteriormente se separan las dos hebras y la herramienta se desplaza aguas arriba de la hebra en busca de su diana (Nishimasu *et al.*, 2014; Sternberg *et al.*, 2014). Tras la localización de la secuencia diana mediante la unión por complementariedad de bases y acomodación del heterodúplex sgRNA:DNA diana en el surco de carga positiva alojado entre los lóbulos *REC* y *NUC*, se produce la activación de los dominios nucleasa y el corte del DNA posicionado con los grupos fosfato escindibles correctamente a 3 o 4 nucleótidos de distancia de *PAM*.

Después del reconocimiento y la unión, la nucleasa Cas9 desencadena la ruptura de doble hebra (DSB) en el ADN cromosómico. Esta rotura en la doble cadena debe ser reparada por la maquinaria celular. Aquí es donde se va aprovechar para generar modificaciones en lugares concretos del genoma. Hay dos patrones de reparación, denominados NHEJ y HDR. El mecanismo NHEJ es caracterizado por ser propenso a errores. Ya que si las mutaciones tienen lugar en el interior de exones codificantes darán lugar a cambios en la pauta de lectura que pueden dar lugar a la aparición de codones de parada prematuros. Por lo que, puede generarse el silenciamiento de genes o elementos genómicos. Por su parte, el patrón de reparación HDR sólo tendrá lugar ante

la presencia de una secuencia nucleotídica añadida de forma exógena y que por tanto podrá ser usada como herramienta de modificación altamente precisa (ya que es el propio investigador el que decide cuál será la secuencia que será introducida en el lugar de la escisión). Dicha secuencia deberá ser de doble cadena y homóloga a las regiones flanqueantes de la región del ADN escindida donde vaya a incorporarse (Ran *et al.*, 2013; Wang, La Russa y Qi, 2016; Xiong *et al.*, 2016).

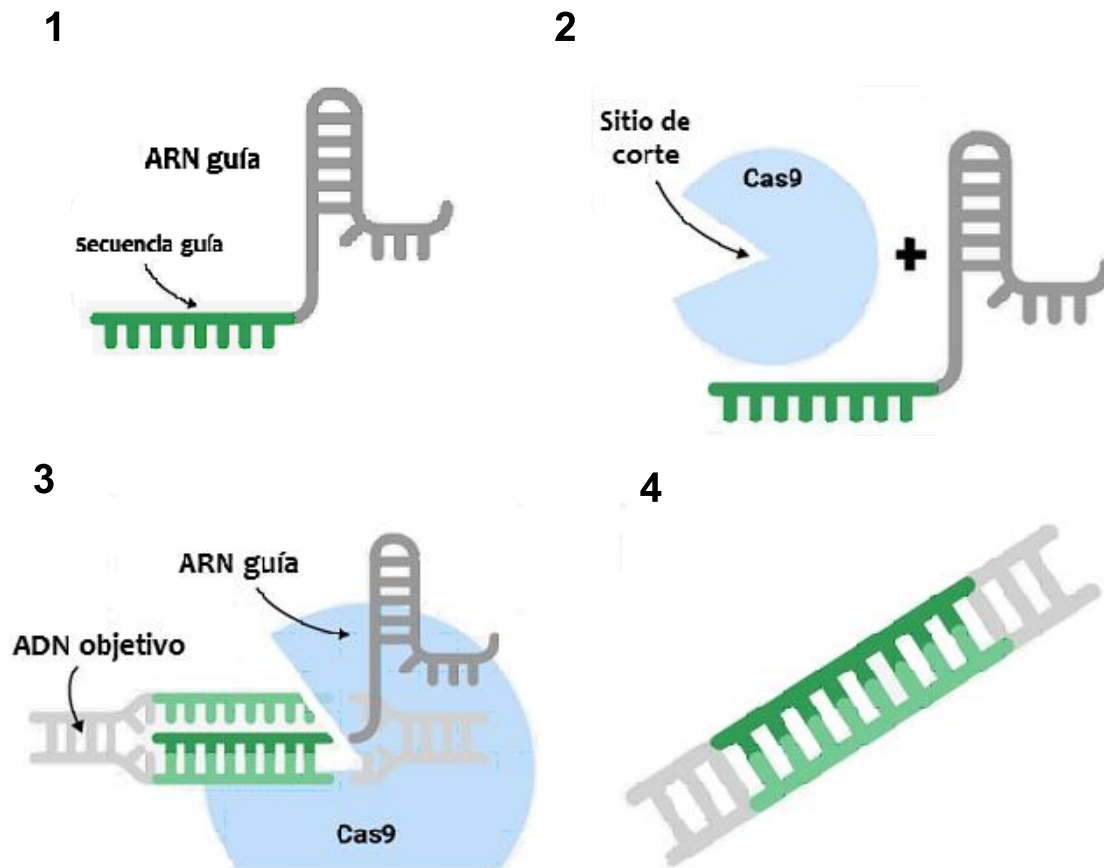


Figura 6. Edición de un gen utilizando la técnica de CRISPR/Cas9: 1) Creación del ARN guía por los científicos, una secuencia genética que coincide con la pieza de ADN que desean modificar. 2) Al ARN guía se le añade la proteína Cas, que actuara cortando el ADN. 3) El ARN guía se acopla con la secuencia del ADN que queremos modificar, y Cas lo corta. 4) Otra pieza de ADN reemplaza el ADN escindido, y las enzimas reparan los cortes. Adaptado de (Carl zimmer, 2018).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es hacer una revisión bibliográfica relativa a los métodos de transformación y modificación genética de la cianobacteria *S. elongatus*. El objetivo específico es cuantificar la frecuencia de cada una de las estrategias de transformación y de los sistemas utilizados para la modificación genética en base a la información bibliográfica del NCBI citando ejemplos concretos donde se han usado en el campo de la investigación en cianobacterias.

3. METODOLOGÍA

3.1 Búsquedas y clasificación de la bibliografía

Para realizar este trabajo se ha empleado el portal de búsqueda de documentos científicos PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), donde se han seleccionado listas de artículos utilizando descriptores de búsqueda. Las listas de artículos se descargaron a ficheros Excel para su posterior clasificación en base a criterios establecidos en este trabajo. Las listas obtenidas según los descriptores empleados se muestran como tablas en el apéndice ([ver apartado 6: apéndice](#)).

Cada uno de los trabajos seleccionados empleando los distintos descriptores se clasificó en base a 3 criterios. El primero relacionado con el tipo de trabajo (artículo de revisión u original) y los otros dos criterios relacionados con los métodos de transformación y sistemas de modificación genéticos empleados.

También se han empleado el programa informático ChemDraw Ultra 9.0 (Cousins, 2005), para la realización de figuras y portales de búsqueda de documentos científicos como Google Scholar, entre otros, para la búsqueda de información relevante en el presente trabajo.

3.2 Gestor de referencias

Las referencias bibliográficas se gestionaron a través de la aplicación de escritorio Mendeley desktop. Al realizar las búsquedas en Pubmed, se seleccionaron todas las referencias que se mostraron con las distintas palabras clave. Para poder descargarlas seleccionamos: "Send to", en el menú desplegable, después "file" y las exportamos en formato MEDLINE (.txt). En Mendeley importamos los resultados para los tres

descriptores. Los agrupamos y los organizamos en formato Harvard. Las referencias se pueden encontrar al final del documento, donde solo se incluyen las publicaciones a las que se ha hecho referencia.

3.3 Herramientas de visualización y análisis de datos

La elaboración de gráficos se realizó en el caso de histogramas y gráficos de porciones utilizando Microsoft Excel. Los diagramas de Venn se obtuvieron mediante la herramienta online Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. *An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Oliveros, 2007).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estrategias de búsqueda

Para la elaboración de listas actualizadas de artículos originales de investigación y revisiones correspondientes a métodos de transformación y herramientas de modificación genómica en la cianobacteria *S. elongatus*, se utilizó la base de datos PubMed del NCBI. Para realizar el filtrado de trabajos que incluyesen la mencionada especie el término común a las 3 búsquedas realizadas fue el nombre del microorganismo "*Synechococcus elongatus*". Este descriptor se combinó con las siguientes palabras 1) *Transformation*, 2) *Mutagenesis* y 3) *Genetic Modification*. Las 3 búsquedas independientes resultaron en un total de 17, 69 y 12 artículos para las búsquedas 1, 2 y 3, respectivamente. Descartamos tras su revisión aquellos en los que no se modificaba el genoma de *S. elongatus*, sino otras bacterias, quedando el número de artículos en 11, 55 y 9 (Figura 7). Para realizar las búsquedas de términos combinados se utilizó el operador booleano AND. En ninguna de las búsquedas realizadas se excluyó utilizando algún término y el operador NOT ya que el objetivo era recoger la bibliografía y comparar tanto el número de artículos totales como el grado de solapamiento entre las búsquedas realizadas.

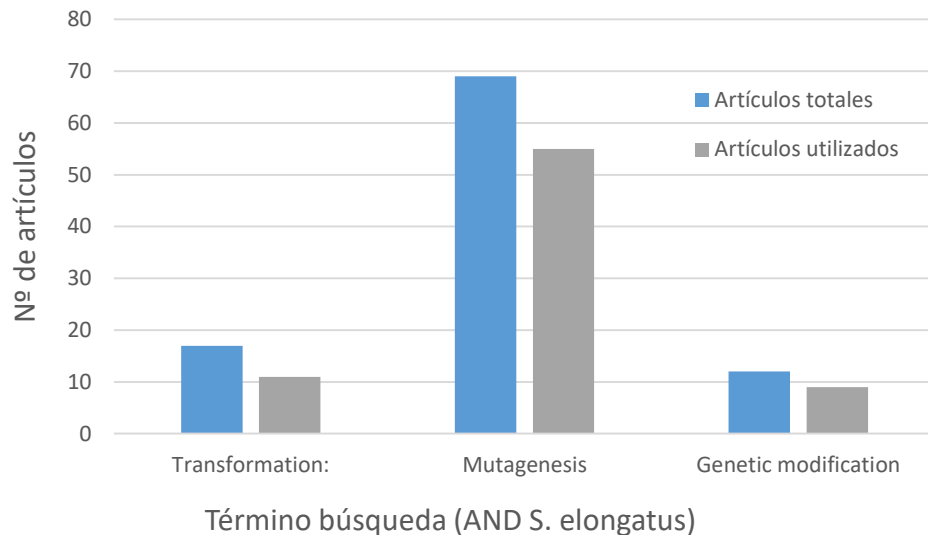


Figura 7. Número de artículos empleando términos específicos y el operador booleano AND. Las barras indican los artículos totales y los utilizados, obtenidos en cada una de las 3 búsquedas realizadas en PubMed, el 21 de marzo de 2018 utilizando el operador booleano AND el término *S. elongatus* y cada uno de los términos indicados.

El mayor número de artículos corresponde a las búsquedas en las que se utilizó el término *Mutagenesis*, lo que resultó en aproximadamente 4-6 veces el número de artículos recuperados para los otros términos. Posteriormente nos preguntamos si la lista más amplia (69 artículos) recogía todos o algunos de los identificados en las otras listas. Para ello se utilizó el identificador PMIDX (donde X representa un número identificativo de cada publicación) y la herramienta online Venny (Oliveros, 2007) que permite representar la información mediante diagramas de Venn (Figura 8).

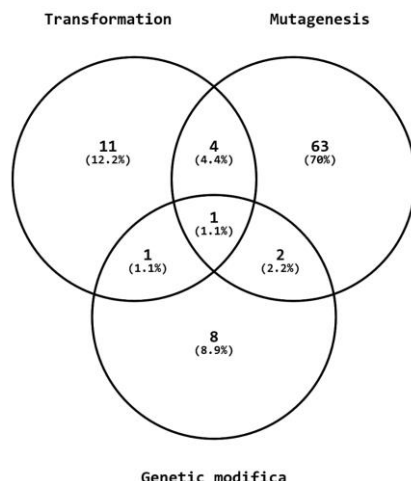


Figura 8. Diagrama de Venn de los artículos identificados en cada búsqueda. Las circunferencias corresponden al término de búsqueda indicado y contienen los números absolutos del número de publicaciones identificadas individualmente en cada búsqueda, identificadas por pares de búsqueda (intersecciones con valores 4, 1 y 2, o identificadas en las 3 búsquedas (intersección central)).

El número total de artículos diferentes obtenido fue de 82 (11+63+8). El número de artículos identificados en más de una búsqueda es relativamente bajo: 4, 1 y 2 artículos en las parejas de búsquedas *Transformation-Mutagenesis*, *Transformation-Genetic Modification* y *Mutagenesis-Genetic Modification*, respectivamente. Tan sólo 1 artículo en común se encontró en las 3 búsquedas independientes.

4.2 Clasificación de las referencias bibliográficas

Tras obtener la lista total de artículos se realizó la lectura de los trabajos identificados con el objetivo de clasificarlos en base a las estrategias de modificación genética y transformación en la cianobacteria *S. elongatus*. En primer lugar, se clasificaron los trabajos en revisiones o artículos originales de investigación observándose que en todos los casos los trabajos correspondían a artículos originales, exceptuando 2 revisiones (review). Seguidamente se realizó la clasificación en función de la estrategia de transformación empleada. Tras haber leído los trabajos, con especial detalle los métodos correspondientes se identificaron un total de 3 métodos de transformación: transformación natural, conjugación y electroporación. El primero y más utilizado constituye el sistema favorito (Figura 9) el cual aprovecha la capacidad inherente natural de *S. elongatus* para adquirir DNA exógeno y ser transformado. La transformación natural es el sistema de transformación empleado en el 73% de los trabajos

seleccionados en los que el DNA transformado se vehiculiza en forma de plásmido. El siguiente método corresponde con la conjugación bacteriana en el que la bacteria *E. coli* actúa como donador del plásmido que se moviliza. Este método representa el 19% y constituye el segundo más empleado. Finalmente, con una proporción del 8% encontramos la electroporación que representa el método menos representado. No se encontró ningún trabajo en el que se emplease más de un método de transformación.

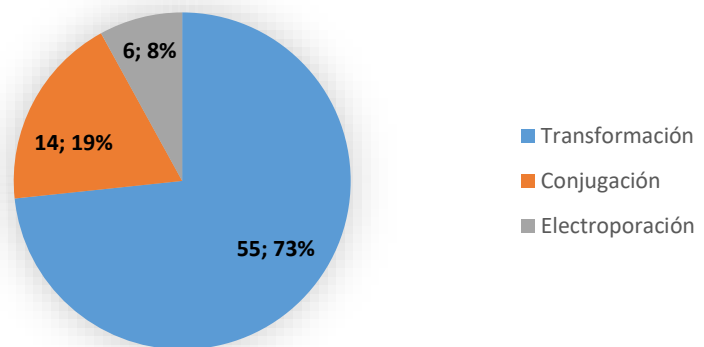


Figura 9. Métodos de transformación empleados para transformar *Synechococcus elongatus*.

Los números absolutos y % de trabajos en los que se identifica uno de los métodos indicados de transformación aparecen indicados en cada sector.

Tras la clasificación inicial basada en el método de transformación se realizó una segunda clasificación basada en la estrategia empleada para la modificación genética de *S. elongatus* (Figura 10). En todos los trabajos los plásmidos obtenidos tienen el propósito de generar mutantes nulos, puntuales o insertar genes en determinadas localizaciones cromosómicas. Para ello se emplean plásmidos que no se replican en *S. elongatus* y por tanto deben integrarse parcial o completamente en el cromosoma bacteriano usando sistemas de recombinación. Tras examinar la lista de artículos se observó que las construcciones presentes en los plásmidos son integradas mediante doble recombinación homóloga en el cromosoma de *S. elongatus* utilizando el sistema propio de recombinación de la bacteria o utilizando sistemas de recombinación heterólogos expresados en *Synechococcus*. También se identificaron trabajos en los que se emplea el sistema de modificación genética CRISPR. Casi la totalidad de los trabajos (91%) utilizan el sistema de recombinación propio del hospedador y minoritariamente se emplean sistemas de recombinación heterólogos (sistema FLP/FRT) 3% y las estrategias de edición genómica basada en la tecnología CRISPR (4%).

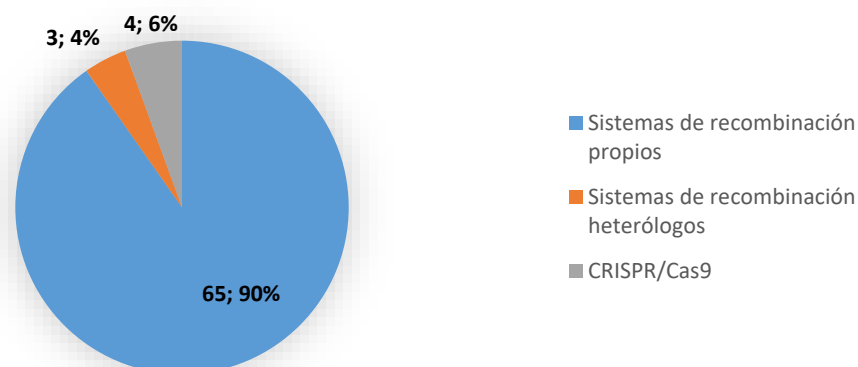


Figura 10. Métodos de modificación en *S. elongatus*. Los números absolutos y % de trabajos en los que se identifican los métodos de modificación indicados aparecen indicados en cada sector.

4.3 Técnicas para la transformación de *S. elongatus*

Entre los métodos que existen para introducir las construcciones en *S. elongatus*, hemos visto que la transformación natural es el método común, para la transformación mediante ingeniería genética. Del total de las 82 publicaciones revisadas un 73% (55 artículos) utilizaban la transformación natural para modificar a *S. elongatus*, siendo así la más utilizada por los investigadores (Figura 9). Nos encontramos que la utilización de este método es muy sencillo, ya que al saber que *S. elongatus* es transformable, podemos inducir la competencia en la célula, según los protocolos ya establecidos ([ver apartado 1.3.1](#)). Hay que tener en cuenta que tras los aislamientos o el subcultivado se puede producir que *S. elongatus*, pierda la capacidad de transformarse con éxito, lo que nos obligaría a utilizar otros métodos (Tsinoremas *et al.*, 1994; Encinas *et al.*, 2014). Los cruces dobles se favorecen sobre los cruces simples en *S. elongatus* después de la transformación natural. Esto se debería a que el ADN se fragmenta por la captación en células competentes y los fragmentos que llevan regiones homólogas se insertan en el genoma. Se observa lo contrario después de la conjugación y la electroporación, que promueven eventos de recombinación única en lugar de doble (Tsinoremas *et al.*, 1994, Iwai *et al.*, 2004).

Hemos estado viendo que, aunque *S. elongatus* es una cianobacteria fácilmente transformable, la conjugación puede ser la vía preferida de transferencia de ADN en ciertos casos, por ejemplo, cuando la longitud del segmento es muy grande o cuando se prefiere una recombinación individual, que normalmente ocurre con una mayor

frecuencia que la doble recombinación, ya que se favorece la formación de merodiploides (cuando se incorpora un fragmento de ADN del exterior que contiene una variante de un gen propio de la bacteria, de manera que ahora posee dos copias de ese gen). En cambio, cuando un plásmido que contiene ADN cromosómico clonado se transforma en las cianobacterias, se favorece la sustitución de genes (lo que sugiere una doble recombinación) (Elhai and Wolk, 1988; Itaya *et al.*, 2018). La conjugación fue utilizada solo en el 19 % de los artículos examinados (Figura 9). Esta diferencia en el porcentaje en comparación con la transformación natural podría deberse a que requiere más pasos adicionales, lo que lleva a su vez a un aumento en el tiempo y la necesidad de más material técnico: la introducción del plásmido deseado en una bacteria, con origen de replicación dentro del donador (normalmente *Escherichia coli*, a partir de ahora *E. coli*), y el posterior procedimiento para eliminar estas células donadoras de los cultivos transformantes, una vez producida la conjugación, porque el crecimiento de las células receptoras es inhibido por las células de *E. coli* (Muhlenhoff y Chauvat, 1996). También podemos encontrar dificultades para introducir DNA de un tamaño grande (ADN > 100 kbp), mediante los protocolos de transformación natural para *S. elongatus* (Itaya *et al.*, 2018). Esto se debe a que el ADN captado por las cianobacterias unicelulares se corta aleatoriamente temprano durante el proceso de transformación. De este modo la eficacia de la transferencia de un segmento de ADN no homólogo disminuye exponencialmente con su longitud (Elhai y Wolk, 1988).

La electroporación es el método para introducir DNA, en *S. elongatus*, menos utilizado, un 8% de los artículos analizados. Este método crea poros transitorios en la membrana plasmática, mediante un campo eléctrico pulsado, por donde accede el ADN, promoviendo la recombinación única en lugar de la doble. Es muy eficaz en bacterias, donde se aconseja usar éste método con ADN plasmídico de gran tamaño, pero en cianobacterias es de las menos utilizadas, ya que se necesita de un electroporador, y la eficiencia es baja en comparación con la transformación natural y la conjugación. Además, las descargas eléctricas se creían que podían inducir mutaciones inesperadas en las cianobacterias, ya que las descargas eléctricas a las que se exponen las células durante los intentos de introducir ADN exógeno se pensaba que causaban transposición de elementos en loci aleatorios en el genoma de las cianobacterias y por otro lado había riesgo de que generaran mutaciones al causar la formación de radicales libres (Onai *et al.*, 2004). A pesar de esto sería una de las primeras opciones para la manipulación genética, ya que no se requieren procedimientos laboriosos y es preferible para introducir ADN plasmídico de gran tamaño (Iwai *et al.*, 2004). En cambio, en *E. coli*, la electroporación se ha convertido en el método de rutina para la transformación en la

gran mayoría de laboratorios del mundo, por la alta eficiencia, por lo que no se descarta que aumente el número de artículos que utilizan este método en un futuro, tras mejorar la eficiencia de la técnica (Iwai *et al.*, 2004).

Tras la búsqueda de los trabajos en Pubmed y su clasificación, donde se han modificado el genoma de *S. elongatus*, se ha seleccionado los estudios que se creen que han tenido más relevancia, según la utilización de los diferentes métodos o herramientas de modificación (ver apartado: [4.2 clasificación de las referencias bibliográficas](#) o [apéndice](#)). Se comentan brevemente, para hacer una idea en qué tipo de trabajos se han utilizado las herramientas y conocer mejor cualidades o utilidades en *S. elongatus*.

4.3.1 Transformación natural

Esta estrategia de transformación ha sido clave para poder realizar diferentes trabajos con respecto al estudio de las características y propiedades de *S. elongatus* como modelo de este grupo de bacterias. Se ha estudiado mediante este método: el almacenamiento de nitrógeno como arginina; la resistencia al estrés por cloruro de sodio; las proteínas del reloj circadiano, su transcripción, sus subestructuras, las interacciones entre ellas, sus mutaciones y determinar el gen de la regulación de retroalimentación negativa; el buen rendimiento del genoma; el gen (*narM*) requerido para la expresión de la actividad de la nitrato reductasa; la proteína estabilizadora de manganeso involucrada en la unión funcional al fotosistema II; mejorar la producción de ácidos grasos libres; la actividad de transporte de nitrito; la interacción con el ficobilisoma; la secuencia completa y el análisis funcional de pANL (plásmido más grande); entre otros.

Se ha seleccionado uno de los trabajos que utilizan la transformación natural en *S. elongatus* para ser comentado, gracias a su posible utilización en el futuro y su repercusión. Las cianobacterias son prometedoras como una estrategia para producir grandes cantidades de carbohidratos con el fin de mitigar las emisiones de CO₂ y producir biocombustibles u otros productos (Li *et al.*, 2016). Gracias a la transformación se ha modificado *S. elongatus* para poder realizar la sobreexpresión y la coexpresión de determinados genes codifican para la celulosa bacteriana, lo que en 2015 resultó en una estirpe optimizada en cuanto a la hidrolización de biomasa para producir etanol (mediante una posterior fermentación). El artículo muestra que, tras la utilización de la

transformación natural para la sobreexpresión de unos determinados genes, aumento el crecimiento celular y la tasa de fotosíntesis, mientras que la coexpresión incrementó significativamente la biomasa y la productividad de los carbohidratos totales (Chow *et al.*, 2015).

4.3.2 Conjugación

En relación con la utilización de la conjugación bacteriana, se han desarrollado estudios utilizando esta técnica sobre: el conjunto genético esencial de un organismo fotosintético, el desarrollo de un sistema de mutagénesis de transposones in vivo de alta frecuencia; la Identificación de genes de división celular de cianobacterias mediante análisis comparativos y mutacionales; la mutagénesis dirigida mediada por CRISPR / Cas9 y la aplicación del sistema de recombinación FLP / FRT; la regulación postraducciona de la asimilación de nitratos; el papel de la fosforilación de *KaiC* en el sistema de reloj circadiano y la modulación dependiente de la luz del período circadiano; entre otros.

Se han desarrollado importantes trabajos sobre el estudio de la funcionalidad de cada locus en el genoma de *S. elongatus*. Esta técnica sirvió para comprender distintos aspectos fisiológicos del microorganismo, como definir el conjunto de genes esenciales necesarios para el crecimiento de un organismo fotosintético (Hutchison *et al.*, 1999; Juhas, Eberl y Glass, 2011; Rubin *et al.*, 2015).

Para definir los genes esenciales se construyó una biblioteca o librería. Se empleo *E. coli* como donador para transformar *S. elongatus*, a través de la conjugación, mediante fragmentos del genoma interrumpidos por un transposón, que contiene un casete de resistencia (para la selección de mutantes) y un código de barras de ADN, que sirven como etiquetas de identificación para la ubicación de cada inserción (Smith *et al.*, 2010; Rubin *et al.*, 2015; Wetmore *et al.*, 2015). Esto permitió a continuación, identificar mediante secuenciación masiva (Tn-seq) los genes donde se inserta el transposón y que por tanto no son esenciales, de aquellos que serían esenciales (solo el 32% de los 2,723 genes de *S. elongatus*). Con la utilidad de identificar los procesos fundamentales que sustentan la vida en una variedad de entornos y como punto de partida para diseñar organismos desde cero.

4.3.3 Electroporación

La electroporación hemos visto a través de la revisión de los artículos que ha sido utilizada para estudiar: el papel de la forma de alto potencial del citocromo b559; la mejorar el reemplazo genético mediado por *rps12*, en *S. elongatus*, del que hemos hablamos en la introducción (apartado [1.3.4 sistemas de recombinación propios](#); la FAPY-DNA glicosilasa necesaria para la supervivencia bajo la alta irradiación de la luz; los mecanismos de defensa contra la transferencia de ADN extraño y su impacto en la ingeniería genética; entre otros trabajos.

El reemplazo de genes en cianobacterias ofrece a través la ingeniería genética y otras técnicas, que *S. elongatus* se ha ya convertido en los últimos años en un modelo para investigar la fotosíntesis. Por ejemplo, en el estudio “The role of the high potential form of the cytochrome b559: Study of *ThermoSynechococcus elongatus* mutants” tras optimizar la técnica de la electroporación y mediante doble recombinación homóloga en *ThermoSynechococcus elongatus*, se introdujeron distintos plásmidos que portaban mutaciones puntuales en el citocromo b559, permitiendo estudiar su función. Este citocromo es un componente esencial del centro de reacción del fotosistema II, en organismos fotosintético, una forma con propiedades similares a algunos citocromos que utilizan las plantas superiores. Se demostró así que esta forma del citocromo b559 funciona en un ciclo de transferencia de electrones secundario para proteger el PSII cuando el sistema de oxidación del agua está dañado (Guerrero *et al.*, 2014).

4.4 Mecanismos para la modificación genética

La gran mayoría de artículos seleccionados utilizan como estrategias para la modificación genética de *S. elongatus* los sistemas de recombinación propios (91%), que posee el propio hospedador (Figura 10). Esto se debe principalmente a la facilidad y la eficiencia para incorporar DNA exógeno al genoma.

También hemos comprobado que los sistemas recombinación heterólogos son los menos utilizados, 4%, para modificar el genoma de *S. elongatus* (Figura 10). Aunque el método tradicional para la modificación genética (recombinación por los sistemas propios de *S. elongatus*) que acabamos de ver, funciona bien, en las investigaciones sobre ingeniería genética a gran escala, no puede emplearse para evaluar el efecto de la eliminación de genes simples, dobles o triples, en cianobacterias. Esto se debe a que la transformación natural depende en gran medida de los marcadores seleccionables, y

la ingeniería genética de múltiples *loci* génicos estará restringida por los limitados marcadores disponibles. Además, el cultivo de las cianobacterias productoras de biocombustibles con marcadores seleccionables que usan antibióticos en la escala industrial también puede plantear problemas de bioseguridad por parte del público y aumentar el costo de todo el proceso. Por lo tanto, la eliminación de los marcadores es necesaria para la modificación genética a gran escala y la futura aplicación industrial de las cianobacterias.

Aunque solo hemos observado la utilización del sistema CRISPR/Cas en 4 artículos del total publicados, es una gran alternativa para los métodos clásicos de la edición genómica dirigida, debido a la precisión en cortes sitio-específicos. Hoy en día, esta técnica permite manipular el genoma celular de formas nunca vistas hasta el momento, combinando a la vez DNA, RNA y proteínas. Es considerado entre los más eficientes, rápidos, sencillos y precisos, pudiendo actuar sobre genes endógenos. De momento su potencial sigue en proceso de desarrollo.

4.4.1 Sistemas de recombinación propios

Casi todos los artículos hasta la fecha han utilizado este método para incorporar el DNA foráneo al genoma de *S. elongatus*. Se ha decidido seleccionar en este apartado los trabajos sobre el reloj circadiano que hemos creído más relevantes.

El ritmo circadiano originalmente se consideraba restringido a organismos eucarióticos, ya que las bacterias no se consideraban lo suficientemente complejas como para poseer un reloj circadiano, se creía que las células se dividían rápidamente (como el caso de muchas bacterias que pueden dividirse muchas veces en un ciclo de 24 horas) (Edmunds, 1983). Los ritmos circadianos se habrían originado en las células más primitivas con el propósito de proteger la replicación del ADN de la alta radiación ultravioleta durante el día. Como resultado de esto, la replicación de ADN se relegó al período nocturno. Actualmente, las cianobacterias son los organismos más simples y los únicos procariotas que se sabe que tienen un reloj circadiano robusto y rigurosamente probado.

Las cianobacterias son, hasta ahora, únicas entre los procariotas al poseer un robusto y simple reloj circadiano, un oscilador autónomo de 24 horas, que puede ser reconstruido in vitro con el ensamblaje de solo tres proteínas (*KaiA*, *KaiB* y *KaiC*), que

genera ritmos de transcripción génica sincronizados con la rotación de la tierra, sólo con la adición de ATP (Cohen y Golden, 2015). *S. elongatus* se ha convertido en un organismo modelo principal para estudiar los detalles moleculares y la regulación del reloj, que se encarga de regula actividades tan diversas como la fijación de nitrógeno (Grobbelaar et al., 1986), la captación de aminoácidos (Chen et al., 1991) y la expresión génica (Liu et al., 1995).

KaiA, *KaiB* y *KaiC* son las proteínas esenciales para la generación del ritmo circadiano. *KaiC* es un regulador negativo de la expresión circadiana de todos los genes, su fosforilación está regulada positivamente por *KaiA* y negativamente por *KaiB* y muestra un ritmo circadiano in vivo. La identificación de los sitios de fosforilación fue crucial para poder estudiar con mayor precisión la función de la fosforilación de *KaiC*. Se estudiaron en 2004 las funciones bioquímicas y fisiológicas de estos sitios mediante el uso de mutagénesis dirigida, tras ser transformada *S. elongatus* por conjugación. Estos resultados son significativos ya que revelan que la fosforilación de *KaiC* regula su actividad de represión transcripcional controlando su afinidad de unión por otras proteínas del reloj, siendo así indispensable para el sistema de reloj cianobacteriano (Nishiwaki et al., 2004).

También se ha identificado los genes involucrados en las rutas de entrada de luz al reloj circadiano *S. elongatus*, útil para comprender la función de estos relojes circadianos y los de células eucariotas ya que comparten una estructura básica (señal de entrada/oscilador interno/señal de salida). Mediante la introducción de un transposón, por conjugación a través de *E. coli*, que posee un gen testigo o “reporter” (secuencia regulatoria de otro gen de interés en plantas, cultivos celulares, animales o bacterias) que muestra ritmos de bioluminiscencia circadianos, identificando el gen *ldpA* de *S. elongatus* que codifica un componente de la vía de entrada al reloj de cianobacterias, período dependiente de la luz. Los resultados sugirieron que la proteína *LdpA* modula el reloj circadiano como una función indirecta de la intensidad de la luz al detectar cambios en la fisiología celular (Katayama et al., 2003).

Si bien el funcionamiento del ciclo circadiano de estos procariotas no depende de mecanismos de retroalimentación de transcripción/traducción de ADN, para los seres eucariotas sí sería esta última la manera de regular sus ritmos circadianos. De hecho, aunque los ciclos de eucariontes y procariontes comparten la arquitectura básica (señal de entrada/oscilador interno/señal de salida), no comparten ninguna otra similitud, por lo que se postulan diferentes orígenes para ambos (Moore, 1982).

4.4.2 Sistemas de recombinación Heterólogos

S. elongatus, y otras cianobacterias, se pueden utilizar para la producción de diferentes biocombustibles y moléculas bioquímicas, después de modificar su genoma. como el: etileno, isopreno, acetona, etanol, 1-butanol, isobutanol, isobutiraldehído, 2-metil-1-butanol, 2,3-butanodiol, alcohol graso, ácido graso, ácido láctico y sacarosa (Tan *et al.*, 2013).

Hasta la utilización de este tipo de recombinación, la mayoría de estas estrategias para la producción de biocombustibles y bioquímicos no eran económicamente rentables para la producción a gran escala, debido al bajo rendimiento de los productos biológicos conseguidos (Quintana *et al.*, 2011). El sistema de recombinación *FLP- FRT* muestra un gran potencial en las aplicaciones industriales. La aplicación exitosa del sistema de recombinación *FLP / FRT* en cianobacterias para la construcción de mutantes sin marcadores demuestra la viabilidad y el potencial de la ingeniería genética a gran escala en múltiples sitios de cromosomas con múltiples genes diana, lo cual es útil para construir una fábrica de células cianobacterianas para producir biocombustibles y bioquímicos con alta eficiencia (Tan *et al.*, 2013).

4.4.3 Sistemas de modificación CRISPR

Aunque la ingeniería mediada por CRISPR-Cas9 ha avanzado más rápidamente en eucariotas, también se ha implementado en el mundo de las procariotas en los últimos años, y las cianobacterias no son una excepción, existiendo ya los primeros trabajos.

En el primer intento de modificar mediante este sistema a *S. elongatus* se dieron cuenta que los altos niveles de expresión de la proteína Cas9 eran tóxicos para las cianobacterias y daban como resultado la muerte celular. Se determinó así que la enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes* es tóxica en las cianobacterias, y que la transferencia mediante conjugación de construcciones estables y replicantes, que contuvieran el gen *cas9* produciría letalidad. No obstante, en 2016, mediante la introducción de un sistema de edición del genoma CRISPR / Cas9 en un plásmido que conduce a la expresión transitoria de *cas9*, se logró la edición eficiente del genoma sin marcadores en todo los exconjugantes de cianobacterias. (Wendt *et al.*, 2016).

Además, ya se ha estudiado la primera aplicación de CRISPR-Cas9 para la producción de succinato en *S. elongatus*. Se demostró en este estudio que el sistema CRISPR-Cas9 media efectivamente la rotura de doble cadena (DSB) en el cromosoma, permitiendo una integración genética precisa, mejorando así la eficiencia de recombinación homóloga y permitiendo el uso de una cantidad menor de ADN de plantilla y brazos de homología más cortos. Se demostró que el sistema CRISPR-Cas9 puede activar efectivamente el DSB en el sitio cromosómico cianobacteriano predeterminado y provocar la muerte celular. Este DSB letal atribuye una presión selectiva intrínseca al cortar los cromosomas no modificados, lo que elimina los cromosomas no editados o desencadena la muerte celular si no se produce una recombinación homóloga. Tras la eliminación de ciertos genes, asistido por CRISPR-Cas9, se aumentaron los niveles de succinato significativamente (un aumento de 11 veces), justificando así el uso de CRISPR-Cas9 para la ingeniería del genoma y la manipulación de las vías metabólicas en las cianobacterias (Li *et al.*, 2016).

5. CONCLUSIONES

1. En búsquedas bibliográficas en Pubmed se han recuperado 82 publicaciones distintas de 3 búsquedas independientes combinado el descriptor "*Synechococcus elongatus*" junto a los descriptores: "*mutagenesis*", "*transformation*" y "*genetic modification*".

2. El mayor número de publicaciones recuperada se obtuvo con el término "*mutagenesis*", representando entre 4 y 6 veces el número encontrado con los otros términos

3. 1 sólo artículo se encontró en común en las 3 búsquedas independientes realizadas

4. La transformación natural es el método de transformación más frecuente representando el 73% en los trabajos seleccionados.

5. El segundo método de transformación más frecuente es la conjugación mediada por *E. coli* (19%) al que le sigue la electroporación (8%).

6. Los sistemas de recombinación propios de *S. elongatus* son el mecanismo favorito para el reemplazamiento de alelos silvestres.

CONCLUSIONS

1. Eighty-two different publications from 3 independent searches have been recovered in bibliographical searches in Pubmed combining the descriptor "Synechococcus elongatus" along with other descriptors: "mutagenesis", "transformation" and "genetic modification".
2. The biggest recovery of publications was obtained with the term "mutagenesis", representing 4 to 6 times the amount found with other terms.
3. Only one article in common was found in 3 independent searches.
4. Natural transformation is the transformation method that is employed the most, representing 73% of selected works.
5. The second and third most used transformation methods are E. Coli's mediated conjugation (19%) and electroporation (8%).
6. *S. elongatus* recombination systems are the favorite mechanism for the replacement of wild alleles.

6. PLAN DE TRABAJO

Al ser un Trabajo de Fin de Grado (TFG) bibliográfico, el plan de trabajo no contiene los mismos apartados que estudio de carácter práctico. También encontramos la dificultad para ordenar las tareas debido a que se producen solapamientos unas con otras. Las tareas han sido:

- Solicitud y asignación de tema y tutor del TFG.
- Planteamiento de los objetivos.
- Elaboración del diseño.
- Recolección de datos.
- Lectura y clasificación de los artículos.
- Redacción y elaboración de las figuras.
- Análisis de resultados y redacción.
- Búsqueda bibliográfica.
- Revisión y corrección.
- Elaboración de la presentación.
- Entrega trabajo final.
- Exposición del proyecto.

Cronograma del TFG	2017		2018							2019		
	N/D	E/F	M/A	M/J	J/A	S/O	N/D	E/F	M/A	M/J	M/A	M/J
Solicitud y asignación de tema y tutor del TFG												
Planteamiento de los objetivos												
Elaboración del diseño												
Recolección de datos												
Lectura y clasificación de los artículos												
Redacción y elaboración de las figuras												
Análisis de resultados y redacción												
Búsqueda bibliográfica												
Revisión y corrección												
Elaboración de la presentación												
Entrega trabajo final												
Exposición del proyecto												

7. APÉNDICE

Listado de artículos sacado del motor de búsqueda pubmed para el descriptor transformation, el 21 de marzo de 2018.

1. Efficient delivery of large DNA from *Escherichia coli* to *Synechococcus elongatus* PCC7942 by broad-host-range conjugal plasmid pUB307.
2. Alkane biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* ITEM 5010 through heterologous expression of *Synechococcus elongatus* acyl-ACP/CoA reductase and aldehyde deformylating oxygenase genes.
3. CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production.
4. Towards engineering carboxysomes into C3 plants.
5. Transgenic tobacco plants with improved cyanobacterial Rubisco expression but no extra assembly factors grow at near wild-type rates if provided with elevated CO₂.
6. Shifts in Cyanobacterial Strain Dominance during the Onset of Harmful Algal Blooms in Florida Bay
7. Using recombinant cyanobacterium (*Synechococcus elongatus*) with increased carbohydrate productivity as feedstock for bioethanol production via separate hydrolysis and fermentation process.
8. Development of a high-frequency in vivo transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
9. Cyanobacterial defense mechanisms against foreign DNA transfer and their impact on genetic engineering.
10. Application of the FLP/FRT recombination system in cyanobacteria for construction of markerless mutants.
11. Ethylene synthesis and regulated expression of recombinant protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803.
12. A point mutation in the *Medicago sativa* GSA gene provides a novel efficient selectable marker for plant genetic engineering.
13. Specialized techniques for site-directed mutagenesis in cyanobacteria.
14. Detection of rhythmic bioluminescence from luciferase reporters in cyanobacteria.
15. Identification and characteristics of a cyanobacterium isolated from a hot spring with dissolved inorganic carbon.

16. High-frequency gene replacement in cyanobacteria using a heterologous *rps12* gene.
17. Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.

Listado de artículos sacado del motor de búsqueda pubmed para el descriptor mutagenesis, el 21 de marzo de 2018.

1. Studies on cyanobacterial protein PipY shed light on structure, potential functions, and vitamin B(6) -dependent epilepsy.
2. Alcohol-tolerant mutants of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 obtained by single-cell mutant screening system.
3. Identification of residues important for the activity of aldehyde-deformylating oxygenase through investigation into the structure-activity relationship.
4. Mutagenesis and redox partners analysis of the P450 fatty acid decarboxylase OleT(JE).
5. Unique attributes of cyanobacterial metabolism revealed by improved genome-scale metabolic modeling and essential gene analysis.
6. Structure-oriented substrate specificity engineering of aldehyde-deformylating oxygenase towards aldehydes carbon chain length.
7. A Combined Computational and Genetic Approach Uncovers Network Interactions of the Cyanobacterial Circadian Clock.
8. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973.
9. Directed evolution increases desaturation of a cyanobacterial fatty acid desaturase in eukaryotic expression systems.
10. The essential gene set of a photosynthetic organism.
11. Functional Dependence between Septal Protein SepJ from *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 and an Amino Acid ABC-Type Uptake Transporter.
12. *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂.

- 13.** Crystal structure of the catalase-peroxidase KatG W78F mutant from *Synechococcus elongatus* PCC7942 in complex with the antitubercular pro-drug isoniazid.
- 14.** Structural and functional consequences of removing the N-terminal domain from the magnesium chelatase ChlH subunit of *ThermoSynechococcus elongatus*.
- 15.** The crystal structure of isoniazid-bound KatG catalase-peroxidase from *Synechococcus elongatus* PCC7942.
- 16.** Development of a high-frequency in vivo transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
- 17.** Deletion of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 *kaiAB1C1* gene cluster causes impaired cell growth under light-dark conditions.
- 18.** An arginine tetrad as mediator of input-dependent and input-independent ATPases in the clock protein KaiC.
- 19.** The role of the high potential form of the cytochrome b559: Study of *ThermoSynechococcus elongatus* mutants.
- 20.** RNA-Seq analysis and targeted mutagenesis for improved free fatty acid production in an engineered cyanobacterium.
- 21.** An allele of the *crm* gene blocks cyanobacterial circadian rhythms.
- 22.** Elucidation of the role of *clp* protease components in circadian rhythm by genetic deletion and overexpression in cyanobacteria.
- 23.** Application of the FLP/FRT recombination system in cyanobacteria for construction of markerless mutants.
- 24.** Negative control of cell size in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 by the essential response regulator RpaB.
- 25.** Sequence determinants of circadian gene expression phase in cyanobacteria.
- 26.** Spatial and temporal organization of chromosome duplication and segregation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
- 27.** CmpR is important for circadian phasing and cell growth.
- 28.** Dephosphorylation of the core clock protein KaiC in the cyanobacterial KaiABC circadian oscillator proceeds via an ATP synthase mechanism.
- 29.** Interactions between histidine kinase NblS and the response regulators RpaB and SrrA are involved in the bleaching process of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
- 30.** Structural basis for the regulation of NtcA-dependent transcription by proteins PipX and PII.

31. Three major output pathways from the KaiABC-based oscillator cooperate to generate robust circadian kaiBC expression in cyanobacteria.
32. Effects of spontaneous mutations in PipX functions and regulatory complexes on the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942.
33. A novel allele of kaiA shortens the circadian period and strengthens interaction of oscillator components in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
34. Chimeric nitrogenase-like enzymes of (bacterio)chlorophyll biosynthesis.
35. Nitrite transport activity of the ABC-type cyanate transporter of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.
36. A small heat-shock protein confers stress tolerance and stabilizes thylakoid membrane proteins in cyanobacteria under oxidative stress.
37. Structural, functional, and mutational analysis of the NblA protein provides insight into possible modes of interaction with the phycobilisome.
38. X-ray crystallographic and biochemical characterizations of a mutant photosystem II complex from *Thermosynechococcus vulcanus* with the psbTc gene inactivated by an insertion mutation.
39. The complete sequence and functional analysis of pANL, the large plasmid of the unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
40. Induction of a group 2 sigma factor, RPOD3, by high light and the underlying mechanism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
41. The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine.
42. Reassessment of the in vivo functions of DNA polymerase I and RNase H in bacterial cell growth.
43. A *Synechococcus elongatus* PCC 7942 mutant with a higher tolerance toward the herbicide bentazone also confers resistance to sodium chloride stress.
44. Specialized techniques for site-directed mutagenesis in cyanobacteria.
45. labA: a novel gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC.
46. Fate determination of the flavin photoreceptions in the cyanobacterial blue light receptor TePixD (TII0078).
47. Analysis of KaiA-KaiC protein interactions in the cyano-bacterial circadian clock using hybrid structural methods.
48. High-throughput functional analysis of the *Synechococcus elongatus* PCC 7942 genome.

49. Functionally important substructures of circadian clock protein KaiB in a unique tetramer complex.

50. Transcriptional regulation of the circadian clock operon *kaiBC* by upstream regions in cyanobacteria.

51. Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses.

52. Posttranslational regulation of nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.

53. Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

54. NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts.

55. High-frequency gene replacement in cyanobacteria using a heterologous *rps12* gene.

56. Phase determination of circadian gene expression in *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

57. A novel gene (*narM*) required for expression of nitrate reductase activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC7942.

58. Isolation and functional characterization of Ca²⁺/H⁺ antiporters from cyanobacteria.

59. Biochemical properties of CikA, an unusual phytochrome-like histidine protein kinase that resets the circadian clock in *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

60. *IdpA* encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependent modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

61. Mutations in KaiA, a clock protein, extend the period of circadian rhythm in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

62. N-terminal truncations of manganese stabilizing protein identify two amino acid sequences required for binding of the eukaryotic protein to photosystem II and reveal the absence of one binding-related sequence in cyanobacteria.

63. *nblS*, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

64. A domain of the manganese-stabilizing protein from *Synechococcus elongatus* involved in functional binding to photosystem II.

65. Unusual regulatory elements for iron deficiency induction of the *idiA* gene of *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

66. Targeted disruption of *psbX* and biochemical characterization of photosystem II complex in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.

67. The FAPY-DNA glycosylase (Fpg) is required for survival of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* under high light irradiance.

68. Two regions of the Mn-stabilizing protein from *Synechococcus elongatus* that are involved in binding to photosystem II complexes.

69. Solution structure of cytochrome c6 from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.

70. Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.

Listado de artículos sacado del motor de búsqueda pubmed para el descriptor genetic modification, el 21 de marzo de 2018.

1. CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production.

2. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity.

3. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973.

4. Digalactosyldiacylglycerol is essential in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, but its function does not depend on its biosynthetic pathway.

5. Application of the FLP/FRT recombination system in cyanobacteria for construction of markerless mutants.

6. Exploring the photosynthetic production capacity of sucrose by cyanobacteria.

7. A novel allele of *kaiA* shortens the circadian period and strengthens interaction of oscillator components in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

8. Robust circadian clocks from coupled protein-modification and transcription-translation cycles.

9. Comparative analysis of *idiA* and *isiA* transcription under iron starvation and oxidative stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wild-type and selected mutants.

10. Growth engineering of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for mixotrophy under natural light conditions for improved feedstock production.

11. Transcription of a "silent" cyanobacterial *psbA* gene is induced by microaerobic conditions.

12. Deciphering cyanobacterial phenotypes for fast photoautotrophic growth via isotopically nonstationary metabolic flux analysis.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amin, A. *et al.* (1991) «Synapsis, strand scission, and strand exchange induced by the FLP recombinase: analysis with half-FRT sites.», *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 11(9), pp. 4497-508. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1875935> (Accedido: 2 de mayo de 2019).
- Andersson, C. R. *et al.* (2000) «Application of bioluminescence to the study of circadian rhythms in cyanobacteria.», *Methods in enzymology*, 305, pp. 527-42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10812624> (Accedido: 21 de octubre de 2018).
- Andreason, G. L. (1993) «Electroporation as a technique for the transfer of macromolecules into mammalian cell lines», *Journal of Tissue Culture Methods*, 15(2), pp. 56-62. doi: 10.1007/BF01667362.
- Berla, B. M. *et al.* (2013) «Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities», *Frontiers in Microbiology*, 4, p. 246. doi: 10.3389/fmicb.2013.00246.
- Bhaya, D., Davison, M. y Barrangou, R. (2011) «CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation», *Annual Review of Genetics*, 45(1), pp. 273-297. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132430.
- Brocks, J. J. *et al.* (1999) «Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes.», *Science (New York, N.Y.)*, 285(5430), pp. 1033-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446042> (Accedido: 28 de diciembre de 2018).

- Brown, T. A. (2016) *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Buick, R. (1992) «The Antiquity of Oxygenic Photosynthesis: Evidence from Stromatolites in Sulphate-Deficient Archaean Lakes», *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 74-77. doi: 10.2307/2876062.
- Carl zimmer (2018) *CRISPR | ChileBIO*, *Nature News*. Disponible en: <https://www.chilebio.cl/edicion-de-genomas/crispr/> (Accedido: 21 de mayo de 2019).
- Charpentier, E. y Marraffini, L. A. (2014) «Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering», *Current Opinion in Microbiology*, 19, pp. 114-119. doi: 10.1016/j.mib.2014.07.001.
- Chen, I. y Dubnau, D. (2004) «DNA uptake during bacterial transformation», *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), pp. 241-249. doi: 10.1038/nrmicro844.
- Chow, T.-J. et al. (2015) «Using recombinant cyanobacterium (*Synechococcus elongatus*) with increased carbohydrate productivity as feedstock for bioethanol production via separate hydrolysis and fermentation process.», *Bioresource technology*. England, 184, pp. 33-41. doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.065.
- Claverys, J.-P., Martin, B. y Polard, P. (2009) «The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism», *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), pp. 643-656. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00164.x.
- Clerico, E. M., Ditty, J. L. y Golden, S. S. (2007) «Specialized techniques for site-directed mutagenesis in cyanobacteria.», *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. United States, 362, pp. 155-171. doi: 10.1007/978-1-59745-257-1_11.
- Cohen, S. E. y Golden, S. S. (2015) «Circadian Rhythms in Cyanobacteria», *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(4), pp. 373-385. doi: 10.1128/MMBR.00036-15.
- Cousins, K. R. (2005) «ChemDraw Ultra 9.0. CambridgeSoft, 100 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140.» American Chemical Society. doi: 10.1021/JA0410237.
- Edmunds, L. N. (1983) «Chronobiology at the cellular and molecular levels: Models and mechanisms for circadian timekeeping», *American Journal of Anatomy*, 168(4), pp. 389-431. doi: 10.1002/aja.1001680404.
- Elhai, J. y Wolk, C. P. (1988) «Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria», *Methods in Enzymology*. Academic Press, 167, pp. 747-754. doi: 10.1016/0076-6879(88)67086-8.
- Encinas, D. (2014) «Intercambios de ADN en una cianobacteria modelo (*Synechococcus elongatus*)». Disponible en:

<https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/14823> (Accedido: 5 de febrero de 2019).

- Encinas, D. *et al.* (2014) «Plasmid Conjugation from Proteobacteria as Evidence for the Origin of Xenologous Genes in Cyanobacteria». doi: 10.1128/JB.01464-13.
- Frenkel, A., Gaffron, H. y Battley, E. H. (1950) «PHOTOSYNTHESIS AND PHOTOREDUCTION BY THE BLUE GREEN ALGA, SYNECHOCOCCUS ELONGATUS, NÄG», *The Biological Bulletin*, 99(2), pp. 157-162. doi: 10.2307/1538735.
- Fitcher, A. B. (1986) «Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*.», *Journal of theoretical biology*, 119(2), pp. 197-204. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3525993> (Accedido: 2 de mayo de 2019).
- Gasiunas, G. *et al.* (2012) «Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), pp. E2579-E2586. doi: 10.1073/pnas.1208507109.
- Goldent, S. S. y Sherman, L. A. (1984) *Optimal Conditions for Genetic Transformation of the Cyanobacterium Anacystis nidulans R2*, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC215375/pdf/jbacter00233-0044.pdf> (Accedido: 9 de octubre de 2018).
- Gray, M. W. (1992) «The Endosymbiont Hypothesis Revisited», *International Review of Cytology*. Academic Press, 141, pp. 233-357. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62068-9.
- Guerrero, F. *et al.* (2014) «The role of the high potential form of the cytochrome b559: Study of *Thermosynechococcus elongatus* mutants.», *Biochimica et biophysica acta*. Netherlands, 1837(6), pp. 908-919. doi: 10.1016/j.bbabo.2014.02.024.
- Hall, D. O. (David O. y Rao, K. K. (1999) *Photosynthesis*. Cambridge University Press. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=6F7yuf1Sj30C&pg=PP8&lpg=PP8&dq=Hall+D:+Photosynthesis.+Cambridge+University+Press+in+association+with+the+Institute+of+Biology:+Cambridge;+1999.&source=bl&ots=fXFY6FHMwQ&sig=ACfU3U0iWKAC8MIH7IL-RekgW7zBFLVNDg&hl=es&sa=X&ve> (Accedido: 5 de febrero de 2019).
- Hutchison, C. A. *et al.* (1999) «Global transposon mutagenesis and a minimal

- Mycoplasma genome.», *Science (New York, N.Y.)*, 286(5447), pp. 2165-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591650> (Accedido: 25 de enero de 2019).
- Ishino, Y. *et al.* (1987) «Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.», *Journal of bacteriology*, 169(12), pp. 5429-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316184> (Accedido: 27 de octubre de 2018).
 - Itaya, M. *et al.* (2018) «Efficient delivery of large DNA from *Escherichia coli* to *Synechococcus elongatus* PCC7942 by broad-host-range conjugal plasmid pUB307.», *Journal of biochemistry*. England. doi: 10.1093/jb/mvy026.
 - Iwai, M. *et al.* (2004) «Improved Genetic Transformation of the Thermophilic Cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1», *Plant and Cell Physiology*, 45(2), pp. 171-175. doi: 10.1093/pcp/pch015.
 - Jackson, D. A., Symons, R. H. y Berg, P. (1972) «Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(10), pp. 2904-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4342968> (Accedido: 29 de diciembre de 2018).
 - Jansen, R. *et al.* (2002) «Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.», *Molecular microbiology*, 43(6), pp. 1565-75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952905> (Accedido: 27 de octubre de 2018).
 - Juhas, M., Eberl, L. y Glass, J. I. (2011) «Essence of life: essential genes of minimal genomes», *Trends in Cell Biology*, 21(10), pp. 562-568. doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.005.
 - Katayama, M. *et al.* (2003) «IdpA encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependent modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.», *Journal of bacteriology*. United States, 185(4), pp. 1415-1422.
 - Kopke, K., Hoff, B. y Kück, U. (2010) «Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/FRT recombination system in filamentous fungi for marker recycling and construction of knockout strains devoid of heterologous genes.», *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 76(14), pp. 4664-74. doi: 10.1128/AEM.00670-10.

- Kusakabe, T. *et al.* (2013) «Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light», *Metabolic Engineering*, 20, pp. 101-108. doi: 10.1016/j.ymben.2013.09.007.
- Li, H. *et al.* (2016) «CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production.», *Metabolic engineering*. Belgium, 38, pp. 293-302. doi: 10.1016/j.ymben.2016.09.006.
- Mali, P., Esvelt, K. M. y Church, G. M. (2013) «Cas9 as a versatile tool for engineering biology», *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 10(10), pp. 957-963. doi: 10.1038/nmeth.2649.
- Marraffini, L. A. y Sontheimer, E. J. (2010) «CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea», *Nature Reviews Genetics*, 11(3), pp. 181-190. doi: 10.1038/nrg2749.
- Mojica, F. J. *et al.* (2000) «Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria.», *Molecular microbiology*, 36(1), pp. 244-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760181> (Accedido: 27 de octubre de 2018).
- Mojica, F. J., Juez, G. y Rodríguez-Valera, F. (1993) «Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites.», *Molecular microbiology*, 9(3), pp. 613-21. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8412707> (Accedido: 20 de febrero de 2019).
- Mojica, F. J. M. *et al.* (2005) «Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements», *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174-182. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3.
- Moore, R. Y. (1982) «The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system», *Trends in Neurosciences*. Elsevier, 5, pp. 404-407. doi: 10.1016/0166-2236(82)90224-7.
- Muhlenhoff, U. y Chauvat, F. (1996) «Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.», *Molecular & general genetics : MGG*. Germany, 252(1-2), pp. 93-100.
- Nishimasu, H. *et al.* (2014) «Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA», *Cell*, 156(5), pp. 935-949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Nishiwaki, T. *et al.* (2004) «Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 101(38),

- pp. 13927-13932. doi: 10.1073/pnas.0403906101.
- Ogawa, T., Matsuoka, M. y Takahama, K. (2001) «Gene replacement in cyanobacteria mediated by a dominant streptomycin-sensitive rps12 gene that allows selection of mutants free from drug resistance markers», *Microbiology*, 147(8), pp. 2077-2087. doi: 10.1099/00221287-147-8-2077.
 - Oliveros, J. C. (2007) «Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.» Disponible en: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Accedido: 24 de febrero de 2019).
 - Onai, K. *et al.* (2004) «Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: a simple and efficient method for gene transfer», *Molecular Genetics and Genomics*, 271(1), pp. 50-59. doi: 10.1007/s00438-003-0953-9.
 - Pourcel, C., Salvignol, G. y Vergnaud, G. (2005) «CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies», *Microbiology*, 151(3), pp. 653-663. doi: 10.1099/mic.0.27437-0.
 - Quintana, N. *et al.* (2011) «Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), pp. 471-490. doi: 10.1007/s00253-011-3394-0.
 - Ramey, C. J. *et al.* (2015) «Genome Engineering in Cyanobacteria: Where We Are and Where We Need To Go», *ACS Synthetic Biology*, 4(11), pp. 1186-1196. doi: 10.1021/acssynbio.5b00043.
 - Ran, F. A. *et al.* (2013) «Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity», *Cell*, 154(6), pp. 1380-1389. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
 - Rubin, B. E. *et al.* (2015) «The essential gene set of a photosynthetic organism.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 112(48), pp. E6634-43. doi: 10.1073/pnas.1519220112.
 - Sadowski, P. (1986) «Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist.», *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 165(2), pp. 341-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3003022> (Accedido: 2 de mayo de 2019).
 - Sadowski, P. D. (1995) «The FliP recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*.», *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 51, pp. 53-91. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7659779> (Accedido: 31 de mayo de 2019).

- Schlake, T. y Bode, J. (1994) «Use of Mutated FLP Recognition Target (FRT) Sites for the Exchange of Expression Cassettes at Defined Chromosomal Loci», *Biochemistry*, 33(43), pp. 12746-12751. doi: 10.1021/bi00209a003.
- Senecoff, J. F., Bruckner, R. C. y Cox, M. M. (1985) «The FLP recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 82(21), p. 7270. doi: 10.1073/PNAS.82.21.7270.
- Shah, S. A. *et al.* (2013) «Protospacer recognition motifs», *RNA Biology*, 10(5), pp. 891-899. doi: 10.4161/rna.23764.
- Shestakov, S. V. y Khyen, N. T. (1970) «Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*», *MGG Molecular & General Genetics*, 107(4), pp. 372-375. doi: 10.1007/BF00441199.
- Smith, A. M. *et al.* (2010) «Highly-multiplexed barcode sequencing: an efficient method for parallel analysis of pooled samples», *Nucleic Acids Research*, 38(13), pp. e142-e142. doi: 10.1093/nar/gkq368.
- Stanier, R. Y. y Bazine, G. C. (1977) «Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria», *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 31(1), pp. 225-274. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.001301.
- Sternberg, S. H. *et al.* (2014) «DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9», *Nature*, 507(7490), pp. 62-67. doi: 10.1038/nature13011.
- Stucken, K., Koch, R. y Dagan, T. (2013) «Cyanobacterial defense mechanisms against foreign DNA transfer and their impact on genetic engineering.», *Biological research*. England, 46(4), pp. 373-382. doi: 10.4067/S0716-97602013000400009.
- Sugita, C. *et al.* (2007) «Complete nucleotide sequence of the freshwater unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 6301 chromosome: gene content and organization», *Photosynthesis Research*, 93(1-3), pp. 55-67. doi: 10.1007/s11120-006-9122-4.
- Szostak, J. *et al.* (1983) «The double-strand-break repair model for recombination», *Elsevier*. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867483903318> (Accedido: 19 de octubre de 2018).
- Takahama, K. *et al.* (2004) «High-frequency gene replacement in cyanobacteria using a heterologous rps12 gene.», *Plant & cell physiology*. Japan, 45(3), pp.

333-339.

- Tan, X. *et al.* (2013) «Application of the FLP/FRT recombination system in cyanobacteria for construction of markerless mutants.», *Applied microbiology and biotechnology*. Germany, 97(14), pp. 6373-6382. doi: 10.1007/s00253-013-4837-6.
- Tang, T.-H. *et al.* (2002) «Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 99(11), pp. 7536-41. doi: 10.1073/pnas.112047299.
- Tsinoremas, N. F. *et al.* (1994) «Efficient gene transfer in *Synechococcus* sp. strains PCC 7942 and PCC 6301 by interspecies conjugation and chromosomal recombination.», *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 176(21), pp. 6764-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961432> (Accedido: 21 de octubre de 2018).
- Veit, B. E. y Fangman, W. L. (1988) «Copy number and partition of the *Saccharomyces cerevisiae* 2 micron plasmid controlled by transcription regulators.», *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 8(11), pp. 4949-57. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3062375> (Accedido: 2 de mayo de 2019).
- Vetter, D. *et al.* (1983) «Site-specific recombination of yeast 2-micron DNA in vitro.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 80(23), pp. 7284-8. doi: 10.1073/pnas.80.23.7284.
- Vogel, A. I. M., Lale, R. y Hohmann-Marriott, M. F. (2017) «Streamlining recombination-mediated genetic engineering by validating three neutral integration sites in *Synechococcus* sp. PCC 7002», *Journal of Biological Engineering*. BioMed Central, 11(1), p. 19. doi: 10.1186/s13036-017-0061-8.
- Wang, H., La Russa, M. y Qi, L. S. (2016) «CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond», *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), pp. 227-264. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
- Waterbury, B. (1987) «Biological and ecological characterization of the marine unicellular Cyanobacterium *Synechococcus*», *Photosynthetic picoplankton Canadian Bulletin of Fisheries Aquatic Sciences*, 214, pp. 71-120. Disponible en: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10010428194> (Accedido: 29 de diciembre de 2018).
- Weaver, J. C. y Chizmadzhev, Y. A. (1996) «Theory of electroporation: A review», *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. Elsevier, 41(2), pp. 135-160.

doi: 10.1016/S0302-4598(96)05062-3.

- Wendt, K. E. *et al.* (2016) «CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973.», *Microbial cell factories*. England, 15(1), p. 115. doi: 10.1186/s12934-016-0514-7.
- Wetmore, K. M. *et al.* (2015) «Rapid Quantification of Mutant Fitness in Diverse Bacteria by Sequencing Randomly Bar-Coded Transposons», *mBio*. American Society for Microbiology, 6(3), pp. e00306-15. doi: 10.1128/MBIO.00306-15.
- Willetts, N. y Wilkins, B. (1984) «Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation.», *Microbiological reviews*, 48(1), pp. 24-41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6201705> (Accedido: 6 de mayo de 2019).
- Wolk, C. P. *et al.* (1984) «Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 81(5), pp. 1561-1565.
- Xiong, X. *et al.* (2016) «CRISPR/Cas9 for Human Genome Engineering and Disease Research», *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. Annual Reviews , 17(1), pp. 131-154. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022258.